

ELECTROPORACIÓN IN-VITRO

*Desarrollo de un nuevo sistema para la electroporación en
superficie de células in-vitro*



Alejandro Pardines Juan

Grado en Biotecnología

26/07/2015

Neurorehabilitación y neuroprótesis

Tutor: Eduardo Fernández Jover

Cotutor: Lawrence Humphreys

ÍNDICE	Pág.
Resumen/Abstract	3
Introducción	4
Antecedentes y objetivos	11
Materiales y métodos	13
Resultados	19
Discusión	32
Conclusiones y perspectivas futuras	38
Bibliografía	38

ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura 1: Electrodos planares	14
Figura 2: Membrana	15
Figura 3: Ensayo de electroporación en neuronas	19
Figura 4: Segundo ensayo de electroporación en neuronas	20
Figura 5: Ensayo de expresión para los estímulos de 150 y 200V	21
Figura 6: Ensayo para la determinación del rango eléctrico óptimo para el plásmido de 7kb	22
Figura 7: Ensayo de expresión en neuroblastomas	23
Figura 8: Gráfica comparativa de la expresión de neuronas frente a neuroblastomas	24
Figura 9: Ensayo comparativos con el mismo voltaje y distinto tamaño de plásmido	25
Figura 10: Formación del halo de expresión de CatCh en comparación expresión de GFP	26
Figura 11: Recuento de NB antes y después de la EP en las esquinas de los electrodos	27
Figura 12: Electrodos antes y después de la electroporación	27
Figura 13: Porcentaje de expresión según el estímulo usado en neuroblastomas	29
Figura 14: Recuento de neuronas antes y después de la EP en las esquinas de los electrodos	29
Figura 15: Electrodos antes y después de la electroporación	30
Figura 16: Porcentaje de expresión según el estímulo usado en neuronas	30
Figura 17: Ensayo de electroporación con el uso de magnetopartículas	31

Resumen

Este estudio tiene como objetivo desarrollar y caracterizar un nuevo sistema para realizar la electroporación *in-vitro* de células adheridas, de forma que permita transfectarlas en cualquier punto de su desarrollo. Este sistema ofrece ciertas ventajas sobre la electroporación de células en suspensión mediante el método convencional. Aquí, ponemos a prueba y caracterizamos diversos parámetros que afectan la eficacia de transfección. Se requiere un equilibrio óptimo del voltaje para crear poros dentro de la membrana, permitiendo así la entrada del material genético y su expresión ectópica, siendo la tasa de supervivencia dependiente de la capacidad de las células para volver a sellar los poros. Hemos probado nuestro sistema en neuronas fetales de corteza de rata y cultivos de líneas celulares de neuroblastoma. Se estudió y comparó el efecto del tamaño del plásmido, así como diversas amplitudes de voltaje para lograr el mayor éxito con la transfección. Por último, hemos probado si la combinación del método de transfección mediante magnetopartículas con nuestro sistema de electroporación, podría aumentar el éxito alcanzado con el sistema por sí mismo.

Abstract

This study aims to develop and characterize a novel system for performing *in-vitro* electroporation to adhered cells allowing for transfections to be performed at whichever point during their development. This system offers certain advantages over conventional cell suspended electroporation. Here, we test and characterize several parameters which effect transfection efficiency. An optimal equilibrium between the voltage intensity is required to create pores within the membrane for genetic material to enter the cell and be ectopically expressed, and the survival rate which depends on the cells capacity to reseal the pores. We tested our system using fetal neurons from rat cortex and neuroblastoma cell line cultures. Here, we studied and compared the effect of the size of the plasmid as well as various voltage amplitudes on transfection success. Finally, we tested if combining the method of magnetoparticle transfections with our electroporation system could augment the success already achieved using the system on its own.

Palabras clave

Electroporación (EP), voltaje, expresión, neurona, neuroblastoma.

Introducción

La genética se ha convertido hoy en día en la principal herramienta para la comprensión de muchas de las enfermedades y trastornos que pueden suceder en los seres vivos. Todos los avances que se han producido a lo largo de los últimos años en esta disciplina han hecho posible el entendimiento del funcionamiento de muchísimos aspectos de la vida de las células, que hasta el momento se desconocían.

La inserción de genes externos que modifiquen el comportamiento celular es uno de los métodos más demandados para la investigación en biología celular. Este hecho nos permite inhibir, compensar o regular casi cualquier proceso que ocurre en el citoplasma o núcleo de una célula, desvelando así cómo actúan y cuáles son las rutas que siguen para realizar una función determinada. Las diversas finalidades que se persiguen en investigación con la transfección de genes exógenos, es la de conferir ventajas selectivas a las células, caracterizar las funciones de proteínas de interés, conocer la localización subcelular de una proteína o ruta, facilitar el estudio de la regulación de la expresión de un gen, obtener proteínas recombinantes etc. Muchísimas son las oportunidades que ofrece la transfección de células para la investigación gracias a la genética o proteómica aplicada.ⁱ

Pero su importancia no termina aquí, sino que con todas estas nuevas herramientas ahora somos capaces, no solo de transfectar células para investigación, sino que la terapia génica ha pasado a ser la más atractiva alternativa para la medicina. La inserción de genes en las células afectadas, que reemplacen los genes silvestres que no funcionan adecuadamente es, sin duda, el objetivo de gran parte de las investigaciones actuales. Esto supone una solución radical a muchas de las enfermedades, sobre todo de base oncológica, atacando el problema desde su raíz, los genesⁱⁱ.

Una vez entendida la importancia de los genes, sus funciones y las aplicaciones clínicas que pueden tener, el siguiente paso es encontrar el mejor modo para aplicarlas. A la hora de comprender cualquier patología, o de avanzar en la investigación, el primer paso es el estudio *in-vitro* donde simular el comportamiento de la célula en las distintas condiciones que creamos adecuadas, ya sea suministrándole proteínas, drogas o intentando solucionar el problema mediante la inserción de genes o RNA de interferencia. Este hecho permite el estudio del comportamiento de las células en un entorno mucho más accesible, rápido y económico. A partir de este obtener conclusiones, propiedades y en definitiva información que será utilizada para continuar en investigación.

Cuando hablamos de transfección de células *in-vitro* no hay que perder de vista dos conceptos que son básicos para el éxito del proceso: eficiencia máxima de transfección y toxicidad o letalidad nula para las células.

El fenómeno de transfección ha sido utilizado para obtener tanto expresión transitoria como estable. Sin embargo y debido a varios aspectos de la célula, la expresión espontánea de ADN es muy ineficiente. Esto es debido a varias causas, entre las que se pueden destacar la carga negativa tanto de las moléculas de ADN como de la superficie de las células, creando una repulsión que dificulta la asociación de la superficie de la célula con el material genético. Otro impedimento es el tamaño del plásmido: cuanto mayor sea el tamaño de este, mayor será la probabilidad de fracaso durante la transfección. La multitud de enzimas dispuestas en la membrana o las barreras que ofrece la célula ante la invasión de cualquier molécula exógena son otro de los impedimentos a tener en cuenta para tener éxito durante el proceso de transfección. Una vez el material genético se ha incorporado a la célula, este ha de viajar con éxito por el citoplasma hasta alcanzar el núcleo y expresarse, por tanto, su estabilidad en el citoplasma será otro de los aspectos que podrán ocasionar problemas durante el proceso de transfección.ⁱⁱⁱ Por lo tanto, será necesario tener en cuenta todos estos aspectos para asegurar el éxito del ensayo.

En la actualidad existen una gran cantidad de metodologías para la inserción de genes en células, entre las que podemos citar la electroporación, microinyección directa, bombardeo de células con microproyectiles, transfecciones mediadas por virus, uso de nanopartículas, agregados químicos, magnetofección y polímeros catiónicos, entre otras.^{iv} Este proyecto propone una versión renovada del método de electroporación para la inserción de genes. Concretamente estudiaremos la transfección de varios plásmidos con distintos tamaños en diferentes poblaciones celulares, incluyendo importantes ventajas con respecto al método ya existente. Pero para poder entender mejor estas ventajas se realizará un pequeño recorrido por dichas técnicas destacando las ventajas y desventajas de cada una.

A grandes rasgos se pueden dividir los métodos de transfección en dos grandes grupos: terapia génica viral, donde se utiliza un virus que sea capaz de infectar la célula y transferir su material genético a esta, y terapia génica no viral, que incluiría el resto de métodos. La transfección de genes mediada por virus es una alternativa que se usa frecuentemente en la actualidad. Esta técnica, una vez se conoce el procedimiento adecuado, es sencilla y el rendimiento de la reacción es bastante alto (alcanzándose en algunos casos el 90%^v). Sin embargo, posee varias desventajas como: el coste económico de las instalaciones para evitar

posibles infecciones, personal cualificado, limitación del vector viral para la inserción de según qué tipo de genes, preparación del mismo eliminando los oncogenes y genes de virulencia, selección del tipo de virus en función del tipo de cultivo y del estadio celular en el que se quiera infectar, etc. Además el mayor impedimento para su uso, es que estos virus siguen teniendo cierta virulencia que puede provocar muerte celular entorpeciendo los resultados.^{vi}

Como segunda opción para la transfección de genes tenemos otros procesos no virales como la microinyección: esta técnica consiste en introducir con una inyección el material genético directamente en la célula. La alta precisión que requiere puede ser una ventaja o una desventaja, según el número de células que se desee transfectar. Mientras que para la creación de plantas transgénicas a partir de la inyección de genes en protoplastos^{vii} o embriones^{viii} puede ser muy útil, ya que es seguro que el material genético se introducirá en la célula. Sin embargo, para estudiar la función de los genes o de proteínas no lo es tanto, puesto que requiere microinyectar los genes célula a célula, además de que el control de la técnica exige un alto grado de precisión y manejo.^{ix}

Otra de las técnicas comentadas es el bombardeo de células con microproyectiles o métodos biobalísticos. Este método de transfección celular consiste en la introducción del ADN adherido a micropartículas que se disparan a alta velocidad sobre las células, sin necesidad de utilizar transportador de ADN y sin limitación de tamaño para este. Ha sido utilizado de forma satisfactoria para introducir ácido nucleico a las células en cultivo de igual forma que ocurre *in vivo*^x. Existen evidencias del uso de esta técnica para la transfección de ovocitos de peces^{xi}, células humanas, fibroblastos de pollo y más tipos celulares^{xii}, y como parte de un protocolo de vacunación, inyectando el gen que codifica la proteína de la matriz del virus de la influenza A^{xiii}. A pesar de los avances alcanzados, la biobalística no es utilizada como una técnica rutinaria, por su carestía, las dificultades para su aplicación, la baja eficiencia conseguida y la existencia de otros métodos mucho más simples y costeables.

Otra forma de introducir el material genético en las células es mediante el uso de métodos químicos. Consisten en la formación de complejos para que las células sean capaces de aceptar o incorporar una cierta molécula a su citoplasma, por medio del mecanismo normal de endocitosis^{xiv}. Entre ellos podemos citar el fosfato de calcio^{xv}, el DEAE dextrano^{xvi} y la lipofección^{xvii}.

El método del fosfato de calcio se basa en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos, formando unos agregados que

son endocitados o fagocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores tales como pequeños cambios en el pH de la solución. Otros factores que intervienen en la eficiencia de la transfección es la cantidad de ADN en el precipitado, el tipo celular usado y el tiempo de exposición de las mismas al precipitado. Tiene como ventajas que permite introducir ADN en gran cantidad de células eucariotas de forma estable o transitoria, requiere de reactivos baratos y de uso frecuente, y un equipamiento tradicional para un laboratorio dedicado al trabajo con líneas celulares^{xviii}.

El diethylaminoethyldextrano (DEAE dextrano) es un polímero catiónico derivado del dextran y su carga positiva le permite unirse a los enlaces aniónicosfosfodiéster del ADN. Estos complejos formados entre el ADN y el dextrano mantienen su carga positiva, lo que le permite unirse a la superficie de la célula cargada negativamente y pasar al interior mediante endocitosis. Este método fue empleado originalmente para facilitar la entrada de ARN de poliovirus a células^{xix} y posteriormente para introducir ADN del virus SV40^{xx}. Tiene como ventajas su sencillez, reproducibilidad y bajo coste, además de que se requiere de pocas cantidades de ADN. Entre sus desventajas se puede señalar el número limitado de líneas celulares en las cuales se pueden obtener resultados eficientes y que solo puede ser usado para la transfección transitoria debido a su elevada toxicidad para las células^{xxi}.

El último método químico de importancia es la lipofección. Este método se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN, llamados liposomas^{xxii}. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del ADN en el citosol. La lipofección es una técnica muy efectiva y poco laboriosa.^{xxiii} Es fácilmente reproducible, se describe tanto para expresión transitoria como estable y es más eficiente que el resto de los métodos químicos. Con esta técnica es posible transfectar ciertos tipos de células donde no resultan otros métodos químicos. Además se consigue introducir ADN de todas las tallas desde oligonucleótidos de cromosomas de levadura a introducción de ARN y proteínas. Las desventajas del método son, aparte del elevado coste de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, siendo necesario optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación de cargas entre el lípido y el ADN, la cantidad de ADN empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero^{xxiv}. Además, con el tiempo acaban siendo tóxicos para el cultivo, por lo que

es necesario eliminar el medio con los lípidos una vez transcurrida la transfección perdiendo los factores de crecimiento que las células han generado durante este tiempo.

Otra técnica de transfección utilizada que cabe destacar es la magnetofección. Es un método de transfección simple y altamente eficiente que utiliza campos magnéticos para concentrar partículas que contienen ácido nucleico en las células diana. El principio de la magnetofección consiste en asociar los ácidos nucleicos con nanopartículas magnéticas catiónicas: estos complejos moleculares después se concentran y se transportan en las células soportadas por un campo magnético adecuado, de tal forma que la fuerza magnética permite una rápida concentración de todo el vector en la superficie celular, por lo que la mayor parte de las células entran en contacto con el material genético. Las nanopartículas magnéticas están hechas de óxido de hierro, que es totalmente biodegradable, y recubiertas con moléculas de propiedades catiónicas, variando en función de las aplicaciones de la técnica. Su asociación con los vectores de genes se logra mediante agregación coloidal inducida por la sal y la interacción electrostática. Las partículas magnéticas se concentran sobre las células diana por la influencia de un campo magnético externo generado por imanes. La captación celular del material genético se logra mediante endocitosis y pinocitosis, dos procesos biológicos naturales. En consecuencia, la arquitectura y estructura de la membrana permanece intacta, en contraste con otros métodos de transfección físicos que dañan la membrana celular. Los ácidos nucleicos se liberan en el citoplasma por diferentes mecanismos, dependiendo de la formulación utilizada. Las nanopartículas magnéticas catiónicas biodegradables no son tóxicas a las dosis recomendadas^{xxv}.

La última técnica que desarrollaremos y en la cual se basa este estudio es la transferencia de genes mediante electroporación (EP). Es una técnica de introducción de ADN a células en cultivo que fue reportada por primera vez en 1982 por Wong y Neumann^{xxvi}, para estudios de transfección de genes. Según cuentan estos autores, las membranas se hacen transitoriamente más permeables por la acción de impulsos eléctricos cortos por encima de una cierta fuerza de campo, sin dañar sus estructuras, de forma que se crean poros transitorios en la membrana que serán aprovechados por los plásmidos para introducirse en citoplasma. Si el voltaje usado no es lo suficientemente alto como para destruir las células, estos poros se regeneran volviendo la célula a su estado normal y habiendo captado el material genético en cuestión. A partir de ese momento, fueron muchas las publicaciones de diversos autores donde se intentaban establecer los parámetros físicos y termodinámicos que regían este proceso, como fueron los estudios de *R. Benz*, entre 1979 y 1982 acerca del comportamiento

de la membrana ante un campo eléctrico a través de varias publicaciones^{xxvii}. Más tarde, comenzaron a aparecer los primeros estudios con éxito donde la EP permitía, en este caso, la inserción de anticuerpos tal y como cuenta *H. Lamberen* su estudio publicado en 1989^{xxviii}, o *R. Chakrabarti*, el cual insertó enzimas gracias a este método en 1990.^{xxix} Otros estudios posteriores con éxito fueron los realizados por *H Potter*, *L Weir*, y *P Leder* donde introdujeron en linfocitos de ratones una inmunoglobulina^{xxx}, o la expresión de genes en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas que llevaron a cabo en 1985^{xxxi}.

Existen varios parámetros que afectan a la eficacia de la técnica. Comenzando por los parámetros eléctricos: el voltaje, el número de pulsos aplicados, la duración de los mismos y el tiempo que se deje entre éstos modelará la eficiencia de la electroporación^{xxxii}. De este modo podemos conseguir que las células capten el ADN en cuestión o que mueran quemadas por que la corriente, ya que esta supera la capacidad eléctrica de las membranas. También es posible realizar fusiones de células a partir de la formación de poros en sus membranas como ocurre en protoplastos^{xxxiii}. Como algunos autores comentaron también influye la temperatura^{xxxiv} y es que el proceso de EP provoca un aumento de esta que influye a la hora de la captación del plásmido o droga, de la supervivencia de la célula y del resellado de la membrana. También es determinante la concentración tanto de células en el medio como de ADN, además de la composición iónica del medio^{xxxv}. Controlando todos estos parámetros seremos capaces de incorporar material genético exógeno en las células.

La principal ventaja de esta técnica es que se aplica a millones de células simultáneamente y es muy sencilla. Además económicamente solo requiere una inversión inicial para la compra del electroporador, pero la reproducción de la práctica es económicamente viable, ya que no precisa de ningún reactivo que encarezca el proceso, simplemente un cultivo de células que crezcan en el medio adecuado. Esta técnica puede ofrecer resultados rápidos y atractivos a la hora de transferir material genético a las células. Prueba de ello es el alto número de experimentos que la EP ha permitido realizar comentados anteriormente. Además, se ha adoptado como una herramienta en la terapia humana, principalmente en investigación y tratamiento contra el cáncer^{xxxvi}. Si a todo ello sumamos la gran utilidad que puede tener esta técnica para el estudio de la función de genes y drogas y el efecto que estos tienen sobre las células, hacen de la EP una herramienta necesaria en el día a día de cualquier laboratorio. Sin embargo no son todas las ventajas, ya que el éxito de la transfección depende del tipo de células que se quiera electroporar. Además, puede ocurrir que el paso de corriente acabe por destruir el 50% de las células. Por ello es importante crear

un estándar de parámetros donde se especifique qué voltaje, número de pulsos, duración y tiempo de espacio entre éstos, son óptimos para según qué tipo celular y conseguir la mayor supervivencia de células. Pero además de esto, existe otra limitación en la técnica: el sistema actual está preparado para que las células estén en suspensión en el medio. Esto puede ser una complicación a la hora de incorporar ADN, proteínas o drogas en determinados estadios, puesto que requiere levantar las células ya adheridas y una vez realizada la electroporación, volver a cultivarlas en otra placa para analizar los resultados y hacer los estudios pertinentes. El hecho de tener que mover las células de un sistema de crecimiento a un sistema de EP y devolverlas a otro sistema de crecimiento puede conllevar que se pierda rendimiento del proceso perdiendo parte de las células o su funcionalidad.

Por otro lado, el caso de las neuronas requiere además de un tratamiento especial, puesto que estas células necesitan crecer en superficie para poder desarrollar los axones y formar sus conexiones sinápticas. Estas células son tremendamente sensibles y su mantenimiento *in-vitro* es muy complicado, de tal forma que es imposible electroporarlas después de varios días de crecimiento, ya que al transferirlas de la superficie de crecimiento a la cubeta de electroporación morirían. Por esta razón, solo es posible la transfección de neuronas mediante electroporación en el día uno de su crecimiento. Es posible transfectar neuronas después de varios días de crecimiento pero mediante el uso de otras técnicas como las explicadas anteriormente, pero ello supone asumir las desventajas que se han comentado. Por lo tanto, para que las neuronas, y no solo estas sino cualquier tipo celular, puedan ser electroporadas es necesaria la creación de un sistema que permita realizar la EP en cualquier estadio celular, sea cual sea el tipo de célula.

Este estudio describe un sistema totalmente novedoso en el cual se realiza la EP en células que crecen fijadas en superficie, haciendo posible su valoración en cualquier estadio de su desarrollo y evitando así todos los inconvenientes que ofrece la EP convencional detallados anteriormente. Este hecho permite electroporar las neuronas en cualquier día de su crecimiento *in-vitro*, ofreciendo ventajas notables como es el estudio del desarrollo de los axones o la sinaptogénesis, proceso donde se desarrollan las conexiones entre los axones de las células pre-sinápticas. La adquisición de construcciones génicas, proteínas o drogas, dotando a las células de unas características concretas, nos permite investigar mucho más a fondo sobre su comportamiento tan peculiar, hecho que sería imposible de estudiar mediante la EP convencional, ya que las neuronas en disolución no formarían estas conexiones y solo seríamos capaces de estudiar su comportamiento administrándoles el material exógeno en el

día uno de su crecimiento. Por lo tanto, y aunque son los primeros pasos hacia el desarrollo de un nuevo sistema, muchas son las ventajas que este nuevo método ofrece con respecto al sistema de EP convencional.

El sistema es muy sencillo, formado por una superficie con 3 electrodos delimitados por una cubeta donde crecerá el cultivo. Es un sistema muy simple y por lo tanto económico, siendo su precio de 5€. Esto ofrece otra ventaja, y es que gracias a su bajo coste hace posible que estos electrodos sean de un solo uso, permitiendo así hacer cada estudio en las condiciones óptimas que ofrece un sistema totalmente nuevo. Para asegurarse de que el cultivo crece en condiciones óptimas sin ningún tipo de contaminación, el pocillo se cubre con una membrana semipermeable transparente hidrófoba que permite el intercambio de los gases CO₂ y O₂ pero no de vapor de agua. Esto evita que el sistema pueda ser contaminado por cualquier patógeno transportado por el aire durante el periodo de crecimiento y a demás protege el sistema de secarse, puesto que evita que se evapore el agua^{xxxvii}.

Antecedentes y Objetivos

Para obtener las conclusiones finales y determinar los parámetros óptimos en el proceso de electroporación de neuronas con el nuevo sistema se han llevado a cabo diversos estudios utilizando dos tipos celulares: estudios en neuroblastomas y en neuronas de córtex fetales de rata. Los neuroblastomas son formas de cáncer infantil que se forman en el tejido nervioso y que por lo general suelen comenzar con mayor frecuencia en las glándulas suprarrenales que se ubican en la parte superior de los riñones.^{xxxviii} Las líneas celulares cancerosas son una ventaja a la hora de realizar estudios *in-vitro*, puesto que se encuentran en constante división, es una fuente inagotable de células que nos permite realizar los experimentos tantas veces como sea necesario para estudiar los parámetros adecuados en la electroporación con este nuevo sistema, pero además también ofrece la ventaja de que no es necesario matar animales para poder conseguir el cultivo de neuronas. El segundo tipo celular utilizado en los experimentos de electroporación han sido neuronas fetales de rata. Mientras que el neuroblastoma presenta la ventaja de que está constantemente en división, es cierto que las células cancerosas no son idénticas a las neuronas normales, y por lo tanto no se comportan de igual modo. Las neuronas tienen ciertas actividades y comportamientos distintos a los neuroblastomas: son postmitóticas, crecen de forma distinta, desarrollando axones y tienen actividad electrofisiológica. Todos estos hechos no ocurren en

neuroblastomas, por lo tanto es necesario el estudio *in-vitro* de neuronas para tener en cuenta todos estos aspectos de las células. Además, el éxito en neuronas asegura mucho más el éxito de la técnica, puesto que son células mucho más sensibles y mucho más difíciles de estudiar y de mantener *in-vitro*. La razón por la que también se utilizaron neuronas fetales es porque tienen la capacidad de ser más estables en cultivos *in-vitro* que las neuronas viejas o de rata y soportan mejor unas condiciones *in-vitro*, simplificando los experimentos.

El objetivo principal de este estudio fue establecer los parámetros óptimos para el éxito de la electroporación en este nuevo sistema creado en colaboración por el instituto nacional de microelectrónica de Barcelona. Para ello se modificó el voltaje y el tiempo de duración de cada pulso y se realizaron estudios sobre el éxito de la transfección, de la expresión y de supervivencia de las células a los distintos parámetros. Sin embargo, algunos parámetros fueron mantenidos en todos los estudios, como los son el número de pulsos: 2, y 2 segundos de tiempo entre cada uno de ellos. Estos parámetros fueron recomendados por la empresa suministradora de los electrodos: BTX Harvard Apparatus por los buenos resultados que obtienen en la técnica convencional con la electroporación en disolución, además de por la limitación del tiempo y material de estudio. Sin embargo es otro reto para investigaciones posteriores, pues la variación de estos parámetros pueden ser elementos clave para la optimización del proceso de electroporación en el nuevo sistema.

Otro de los objetivos de la investigación fue el estudio de los plásmidos para transfectar los distintos cultivos celulares. Como algunos autores cuentan, uno de los parámetros a tener en cuenta en el éxito de la transfección mediante electroporación es el tamaño y forma de la partícula que se pretende introducir en las células, en este caso un plásmido^{xxxix}. Algunos experimentos intentaron establecer el voltaje apropiado para la transfección en función del tamaño del plásmido, y para ello se utilizaron dos construcciones de diferentes tamaños. Una de las construcciones génicas fue portadora únicamente del gen para la proteína verde fluorescente GFP con un tamaño total de 5kb. La segunda construcción fue portadora del gen CatCh más la YFP, una variante de la proteína GFP, con un tamaño total de 7kb. El equipo de investigación se encuentra estudiando, además de este nuevo sistema de electroporación, diferentes estudios relacionados con la optogenética. La optogenética consiste en la inserción de genes microbianos que resultan en la expresión de opsinas sensibles a la luz en la membrana celular de células humanas. La mayoría de estas opsinas vienen en forma de canal iónico o bomba. El gen CatCh^{xl}, cedido por el profesor Ernst Bamberg del instituto Max-Planck, es una variante alterada de estas canalorodopsinas, proteína de 553 aminoácidos. Esta variante de la canalorodopsina es especialmente interesante en

optogenética gracias a que su permeabilidad es aún mayor al ión Ca^{2+} , por ello se encuentra en estudio su efecto sobre ciertas patologías neurodegenerativas. Por esta razón, una de las construcciones que se introdujo en las células fue portadora del gen CatCh junto con el gen *reporter*YFP. La otra construcción fue portadora de la proteína verde fluorescente o GFP. La proteína verde fluorescente monomérica (GFP) consiste en 238 aminoácidos y posee un peso molecular de 27 KDa y no requiere de ninguna otra proteína del hospedador, sustrato o cofactores para fluorescer^{xli}. Su pequeño tamaño la hace atractiva para su uso en este tipo de ensayos, puesto que el tamaño y forma del plásmido serán decisivos para el éxito de la transfección. Se utilizaron dos construcciones diferentes con el objetivo de estudiar otro de los parámetros importantes en esta práctica: el tamaño del plásmido y su relación con el voltaje para el éxito de la transfección.

Por último, se llevaron a cabo una serie de estudios con el uso de magnetopartículas con la finalidad de mejorar el éxito de la transfección. Algunos de estos sistemas fueron electroporados en presencia de estas partículas magnéticas y se compararon los resultados con los electroporados convencionalmente. Estas pequeñas partículas hechas de óxido de hierro y moléculas catiónicas son capaces de atraer el material genético gracias a que poseen una carga positiva en su superficie que interaccionan con la carga negativa del ADN. Si se coloca un imán debajo de los electrodos, estas partículas harán que todo el material genético que hemos depositado en el cultivo se dirija hacia el fondo del electrodo atraídas por el imán que se ha colocado, y direccionándose hacia donde se encuentran las células adheridas. Por tanto prácticamente todas las células estarán en contacto con el material genético de forma mucho más eficiente que cuando se realiza la electroporación simple, donde el material genético estará disperso por todo el cultivo y no solo en el fondo como ocurre con el uso de las magnetopartículas. De este modo, se pretende mejorar los resultados de electroporación en aquellos cultivos donde se utilizaron las magnetopartículas.

Materiales y métodos

Montaje de los electrodos:

Una cubeta de polietileno que sirve como pocillo para los cultivos se pega sobre un sistema de 3 electrodos litografiados en una superficie plana de polímero COP (copolímero de olefina cíclica). Estos electrodos son litografiados de la siguiente forma: A partir de este polímero se adhieren los electrodos utilizando un plotter de corte, se evapora por haz de

electrones de Ti/ Au 10nm/ 100nm de forma que quedan totalmente pegados y finalmente se limpian con acetona o etanol. Se esterilizan y quedan totalmente preparados para su uso. Este sistema consta de 3 parejas de electrodos situados a las distancias que indica la *Figura 1*, de tal forma que cada pareja de electrodos genera un área de 5 mm² donde crecieron y se electroporación las células de ese espacio, permitiendo realizar por tanto 3 electroporaciones distintas por cada sistema.

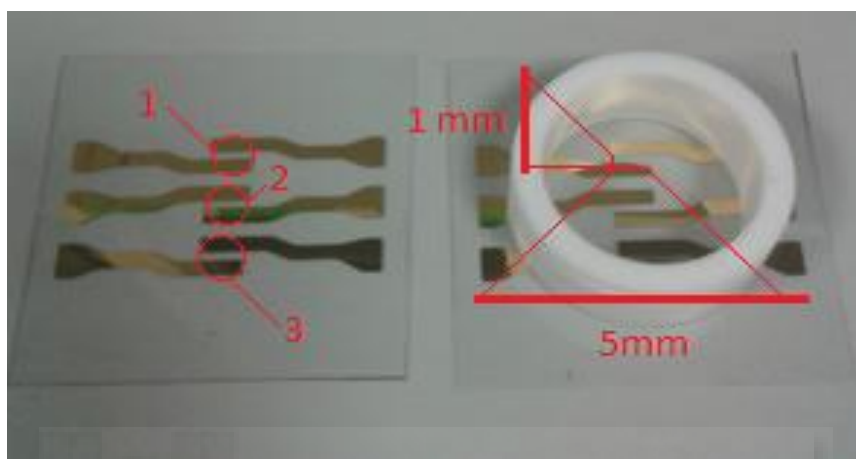


Figura 1. Electrodo​s planares.*Fotografía original tomada en el laboratorio de un electrodo antes de pegar la cubeta (izquierda) y después (derecha). A la izquierda 1,2 y 3 señalizan los 3 electrodos por sistema, a la derecha las medidas del espacio entre cada pareja de electrodos.*

La cubeta fue pegada al electrodo con silicona Dow Corning 3140 RTV coating, no tóxica para las células y sin interferir en la corriente eléctrica que atraviesa el electrodo. Es necesaria una hora de reposo para fijar bien el sistema. Tiene capacidad para albergar 5 ml, aunque en este caso no fue necesario más que 1ml, cantidad suficiente para cubrir toda la superficie con el medio adecuado. Es importante dejar un pequeño porcentaje de electrodo fuera de la cubeta para poder disparar la corriente y que atravesase el cultivo de electrodo a electrodo como se muestra en la imagen, pues son las zonas externas de la cubeta donde se sitúan los dos cables del electroporador que generan la corriente.

El pocillo se cubre con una membrana semipermeable transparente hidrófoba de etileno-propileno fluorado que permite el intercambio de los gases CO₂ y O₂, pero no de vapor de agua.

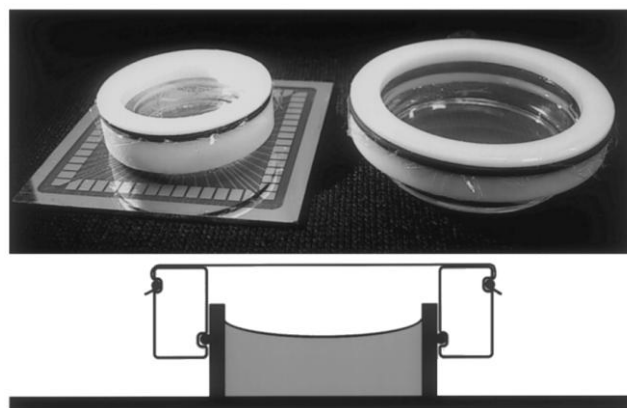


Figura 2. Membrana. Pocillo recubierto con la membrana semipermeable que se ajusta al perímetro gracias a la goma roja. Fotografía obtenida del estudio de Potter^{xlii}.

Pre-tratamiento de los electrodos:

Se aplicó 1ml de solución Poly-D-lysinahidrobromida o PDL preparado a 12 μ g/ml y se dejó actuar durante toda la noche. El PDL provoca un cambio en la carga del electrodo debido a la carga positiva de la lisina, de tal forma que mejora la adhesión de las células con carga negativa en su superficie al sistema. El PDL, sin embargo, es tóxico para las células, por lo que una vez transcurrido el tiempo indicado se realizan dos lavados con PBS para eliminar cualquier resto. El PBS es una solución usada en cultivos para lavados, enjuagues, mantenimiento, disoluciones, etc. es una solución salina equilibrada químicamente que proporciona un entorno que mantiene la integridad estructural y fisiológica de las células in-vitro. Este producto no contiene calcio ni iones magnesio, ni bicarbonato de sodio en su composición, por lo que apoya la actividad durante la tripsinización. Posteriormente, se añadió 1 ml de Laminina preparada a 10 μ g/ml durante 1h. Los electrodos de cultivo celular revestidos de laminina tienen diferentes aplicaciones: mejora de la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular de diversos tipos de células, particularmente neuronas, células epiteliales, miocitos y mioblastos, por lo que fue interesante su uso en este proceso.

Cultivo de Neuroblastomas:

Las líneas de neuroblastoma usadas fueron SH/SYS5. Estas líneas se encuentran creciendo constantemente en placas independientes, a partir de las cuales se preparará, en el momento oportuno, el cultivo en los electrodos. Para poder mantener los cultivos independientes de neuroblastomas fue necesario realizarles un tratamiento con tripsina cada

cierto tiempo (3 o 4 días), pues su constante división provoca que desaparezca el espacio vital para las células y se agoten los nutrientes, llevándolas a la muerte. Por ello, antes de alcanzar la confluencia del 100%, se eliminó el medio en el cual se encontraban creciendo, se limpió dos veces con PBS para asegurarse la eliminación de cualquier célula muerta que pudiese estar en suspensión y se añadieron 3ml de la solución Tripsina + EDTA 0,05% durante 5 minutos aproximadamente. La tripsina es una enzima que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis. Su función es la de despegar las células de la superficie de crecimiento, en este caso las placas de crecimiento del cultivo, y poder tenerlas en suspensión. Una vez en suspensión, se recogieron las células, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1ml de medio, que se dividió en 2 placas, reduciendo la confluencia a menos del 50%. Se añadió medio de cultivo a las placas y se mantuvieron en una atmósfera de 25°C y 5-10% de CO₂. El medio de cultivo contiene: DMEM / F-12, una mezcla 1:1. Esta formulación combina altas concentraciones de DMEM de glucosa, aminoácidos y vitaminas con una amplia variedad de F-12. DMEM / F-12 con suplemento GlutaMAX™ que minimiza la acumulación de tóxicos como el amoníaco y mejora la viabilidad celular y el crecimiento en un formato fácil de usar. No contiene factores de proteínas, lípidos, o de crecimiento. Por lo tanto es necesaria la administración del suplemento con 10% del volumen final de suero bovino fetal (FBS). DMEM / F-12 utiliza un sistema de tampón de bicarbonato de sodio y por lo tanto requiere un entorno de CO₂ 5% para mantener el pH fisiológico. Para evitar la contaminación del cultivo se añadió Penicilina-Estreptomicina en un 1:100 con respecto al volumen total.

A partir de estas placas independientes de neuroblastomas, se obtuvo una concentración de 400.000 células disueltas en el medio de cultivo para neuroblastomas gracias al sistema de conteo automático de células Adam^{MC} Digital Bio y se sembraron en los electrodos ya pre-tratamiento según el punto anterior, se cubrió toda la superficie del electrodo (1 ml aproximadamente) con medio para neuroblastomas. Los cultivos se mantuvieron en los incubadores a una atmósfera idónea para su crecimiento: 37°C, y 5% de CO₂, al igual que los cultivos madre. Estos cultivos permanecieron creciendo *in-vitro* en los electrodos hasta alcanzar una confluencia del 80% aproximadamente. Los cultivos fueron fijados 1 día después de la electroporación, y para ello se añadieron 200 µl de paraformaldehído 4% o PFA al electrodo y se dejó actuar durante 5 minutos. Este fijador actúa desnaturalizando las proteínas y es óptimo para su uso en estudios con fluorescencia puesto que la favorece. Se eliminó todo el medio con el PFA y se dejó durante 20 minutos en 1 ml de PFA. Se añadieron 2 µl del reactivo Hoechst para teñir los núcleos de las células vivas.

Posteriormente, se eliminó todo el medio con el reactivo, se separó la cubeta de la superficie con cuidado de no interferir en el cultivo fijado, se añadió una gota de Mowiol y se colocó el cubreobjetos.

Cultivo de Neuronas fetales de rata:

Las neuronas se extrajeronde la corteza cerebral a los 17 días de gestación y se colocaron en medio neuronal que contuvo:B27 o albúmina sérica bovina, compuesto con antioxidantes, factores de crecimiento, hormonas, vitaminas y varios suplementos nutritivos para la supervivencia de las neuronas en cultivo.FBS que permite la supervivencia de las células de la glía.Glutamina, un precursor necesario para que las células sinteticen el glutamato.Penicilina-Estreptomicina para evitar la contaminación por cualquier patógeno, ymedio neurobasal necesario para la supervivencia de las neuronas. Una vez extraído el cultivo se añadieron 10mg/ml de tripsina, y se dejó actuar en un baño a 37°C durante 20 minutos. La tripsina rompe todas las conexiones que forman las neuronas y con ayuda de la fuerza mecánica usando una pipeta se dejaron las células por separado, listas para preparar el cultivo en los electrodos. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, y se resuspendieron en 1 ml de medio neuronal. Los electrodos fueron preparados con 200.000 células por sistema y se rellenará con un 1,5ml de medio neuronal. Cubrir la superficie con las membranas semitranspirables. Se mantuvieron en el incubador durante 6 días *in-vitro* a una atmósfera idónea para su crecimiento: 37°C, y 5% de CO₂,de tal forma que fueron capaces de crecer y adherirse correctamente a la superficie y de formar todas las conexiones pertinentes. Los cultivos fueron fijados 3 días después de la electroporación, y para ello se añadió 200 µl de paraformaldehído 4% o PFA al electrodo y se dejó actuar durante 5 minutos. Este fijador actúa desnaturalizando las proteínas y es óptimo para su uso en estudios con fluorescencia puesto que la favorece. Se eliminó todo el medio con el PFA y se dejó durante 20 minutos en 1 ml de PFA. Posteriormente se añadieron 2µl del reactivo Hoetsch para teñir los núcleos de las células vivas. Se eliminó todo el medio con el reactivo, se separó la cubeta de la superficie con cuidado de no interferir en el cultivo fijado y se añadió una gota de Mowiolcolocando posteriormente el cubreobjetos.

Plásmidos

Se utilizaron dos construcciones diferentes: Una de las construcciones génicas fue portadora únicamente del gen que codificará la proteína verde fluorescente o GFP obtenido a partir de *Clontechlaboratories*. La construcción consiste en un vector pCMS–EGFP. El promotor es un promotor de citomegaloviruspCMV que permite una alta expresión en células de

mamíferos, en concreto neuronas, células de la glía y neuroblastomas. EGFP es una variante de este plásmido, cuyo fluorocromóforo encuentra desplazado hacia el rojo a 488nm de excitación y con un máximo de emisión en 507nm, aportando mayor brillo y expresión a las células. Esta construcción tiene un tamaño final de 5kb. La segunda construcción fue portadora del gen para la canalorrodopsina o CatCh L132C además del gen reporter escogido que codifique la YFP, y fue cedido por el profesor Ernst Bamberg del instituto Max-Planck. El promotor es igualmente citomegalovirus y el tamaño total fue de 7kb. Con estas dos construcciones se realizaron los estudios pertinentes sobre la relación del tamaño plásmido/voltaje.

Electroporación

El electroporador utilizado fue Electro SquarePorator ECM830 de la *empresa Harvard apparatus*. Los parámetros que variaron en los diferentes estudios fueron los siguientes: Voltaje aplicado (300-100V) y duración del pulso (700-100µs). Los parámetros fijos en todos los estudios fueron 2 pulsos con un espacio de tiempo de 2 segundos entre cada uno de ellos. Se llevaron a cabo dos tipos de electroporaciones:

- **Electroporación simple:** Se añadió al cultivo 10µg de plásmido por ml de medio. Dependiendo del ensayo unas veces será la construcción portadora de GFP y otras de CatCh-YFP
- **Electroporación con magnetopartículas:** Se preparó una disolución donde entraron en contacto 1µg de magnetopartículas con 1µg de plásmido (independientemente de qué construcción se utilizase) y se dejó interaccionar durante 15 minutos. Se agitó la mezcla durante 15 segundos y se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente se añadió la disolución con ambas partículas a los cultivos, se dejó reposar el sistema sobre el imán durante 20 minutos con el fin de que todo el material genético alcanzara el fondo del electrodo y entrara en contacto con las células.

Imágenes

Para los estudios de supervivencia celular se tomaron fotografías al cultivo antes y después de la electroporación justo en la misma región, tomando como referencia las esquinas de cada pareja de electrodos. Por lo tanto, de cada pareja de electrodos se obtuvieron dos fotografías, 6 en total para el sistema completo, que fueron repetidas después de realizar la electroporación. Para ello se utilizó un microscopio óptico Olympus IX51 con un objetivo de 10X. El software utilizado para tomar las fotografías fue DP controller. Posteriormente y una vez

tomadas las fotografías, se utilizó el software ImageJ para realizar el conteo de células que hubo antes y después de la electroporación. Todas las imágenes de células vivas con expresión se realizaron con un microscopio confocal Leica TCS SPE usando un objetivo 40x de inmersión en aceite. Las imágenes fueron tomadas usando una combinación de láseres y filtros en función de los fluoróforos utilizados. Los láseres utilizados fueron los siguientes: 488 nm, 405 nm.

Resultados

1. Ensayos para la determinación del rango eléctrico.

Ensayos en Neuronas fetales de rata:

En una primera toma de contacto con el sistema, se realizaron varias electroporaciones con el fin de determinar cuáles eran los parámetros eléctricos adecuados. Fueron usados 4 electrodos (A,B,C,D) con sus pertinentes 3 electrodos en cada uno de ellos, y para cada electrodo se escogió un estímulo eléctrico distinto buscando determinar el mejor rango eléctrico. El plásmido escogido en este primer ensayo fue portador únicamente del gen de la proteína verde fluorescente o GFP. Algunos de los parámetros eléctricos fueron los detallados en la gráfica, mientras que otros fueron comunes a todos los electrodos.

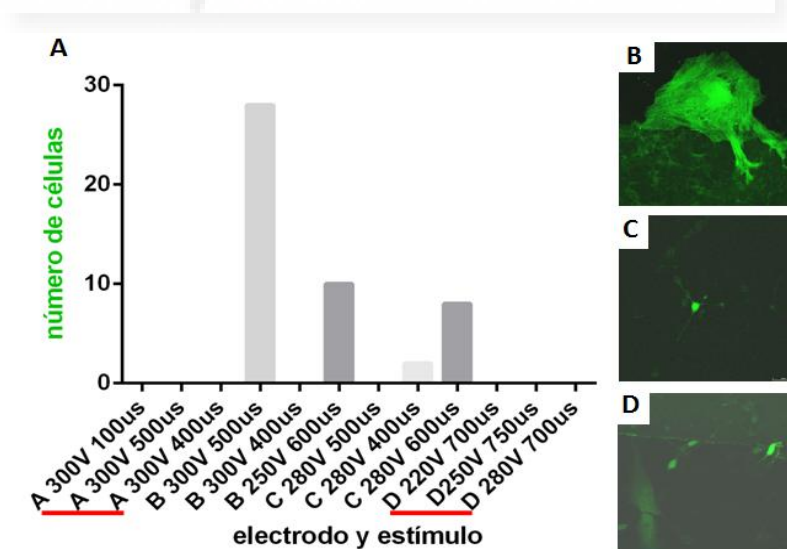


Figura 3. Ensayo de electroporación en neuronas. (A) Representa el número de células que expresan GFP por electrodo en cada uno de los estímulos escogidos. Resultados: 300V-500µs (28), 250V-600µs (10), 280V-400µs (2), 280V-600µs (8). (B) Glía con el estímulo de 300V-500µs (C) Neurona con expresión de GFP con el estímulo de 300V-500µs. (D) Neuronas y Glías con expresión al estímulo de 300V-500µs. Las tres imágenes son originales. Objetivo: 40x. Escala: 100µm.

En la *Figura 3.A* se observa como en los electrodos A y D no se consiguió ningún dato de expresión. En el electrodo A el voltaje fue excesivo y las células murieron quemadas, mientras que en el D la duración de los dos pulsos fueron excesivos muriendo igualmente. Se obtuvieron solo resultados favorables de expresión en los electrodos B y C. En el estímulo de 300V y 500 μ s de duración de pulso se observaron 28 células entre neuronas y glías con expresión del plásmido. En el estímulo de 250V y 600 μ s 10 células expresaron la GFP, en el de 280V-600 μ s se visualizaron 8 células y el estímulo con menor número de células con expresión observada con solo 2 fue el que utilizó 280V y 400 μ s de duración del pulso. La *Figura 3.B* muestra una célula de la glía adherida al margen de un electrodo mostrado en la mitad inferior de la imagen. La *Figura 3.C* muestra una neurona mientras que la *Figura 3.D* muestra tanto neuronas como glías adheridas al electrodo.

En un segundo experimento se focaliza el rango de estímulos usados, de tal forma que se aproximan los voltajes y la duración de los pulsos más a los estímulos con los que se habían obtenido mayor expresión en el experimento anterior, eliminando por completo los estímulos con los que se mataba a las células. El plásmido contenía la GFP. Los estímulos variables se indican en la figura.

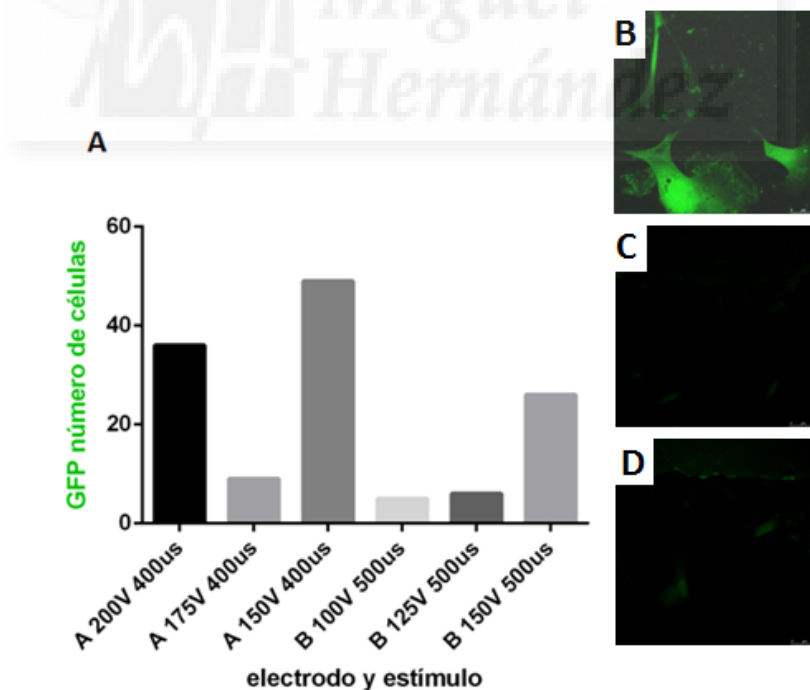


Figura 4. Segundo ensayo de electroporación en neuronas. (A) Representa el número de células que expresan GFP por cada electroporación con distintos estímulos. Resultados: 200V-400 μ s (36), 175V-400 μ s (9), 150V-400 μ s (49), 100V-500 μ s (5), 125V-500 μ s (6), 150V-500 μ s (26). (B, D) Glías y neuronas con expresión (C), Neuronas con expresión de GFP. Imágenes originales. Objetivo: 40x. Escala: 100 μ m.

En este segundo ensayo se obtuvo expresión en todos los estímulos escogidos. Sin embargo, fueron notables los resultados de expresión en los estímulos de 150V y 400µs de duración del pulso con 49 células que expresaron el plásmido, seguido del estímulo de 200V y 400µs con 36 células y del de 150V y 500µs de pulso con 26 células. Estos serían los datos de mejor expresión, por lo que podríamos definir los parámetros entre 150 y 200V y 400µs de duración de pulso como los valores a los que se obtendrían mejores datos de expresión en neuronas según este ensayo. Las Figuras 4.B y D muestran células de la glía y neuronas con expresión de GFP. En la Figura 4.D se puede observar el electrodo en la parte superior de la imagen. La Figura 4.C muestra neuronas de córtex con expresión de GFP. Para poder corroborar los datos de la Figura 4. A se volvieron a realizar las electroporaciones en repetidas ocasiones, esta vez utilizando solo los dos estímulos con los mejores datos de expresión en el estudio anterior.

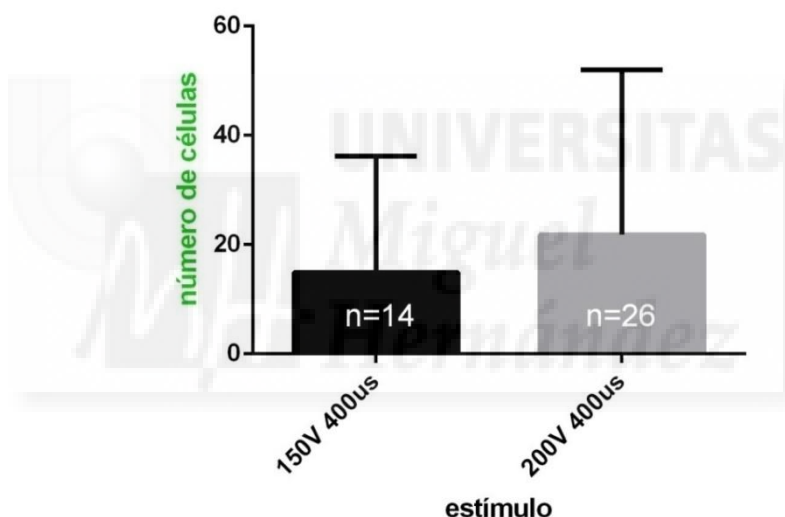


Figura 5: Ensayo de expresión para los estímulos de 150 y 200V. La gráfica muestra una media del número de neuronas que expresaron la proteína GFP: 14 ± 21 DE. con $n=14$ para el estímulo de 150V y 21 ± 30 DE con $n=26$ para el de 200V siendo $P=0,1854$ Mann-Whitney.

La Figura 5 muestra la media para los resultados de expresión. El resultado fue de 14 ± 21 DE con $n=14$ para el estímulo de 150V y 400µs de duración del pulso, mientras que la media de células que expresaron la proteína GFP fue de 21 ± 30 con $n=26$ para el voltaje de 200V y 400µs de duración del pulso, siendo el valor $P=0,1854$ Mann-Whitney. Hubo éxito de expresión en ambos casos. Sin embargo no se obtuvieron datos estadísticamente significativos ($P=0,1854$) entre ambos estímulos. A pesar de ello, se puede observar una tendencia a aumentar la expresión a medida que aumenta el voltaje del estímulo.

Seguidamente a estos estudios se realizó una prueba en neuronas donde el plásmido escogido fuese la segunda construcción portadora del gen CatCh, con el fin de determinar los valores óptimos para la expresión de células variando en este caso el tamaño del plásmido.

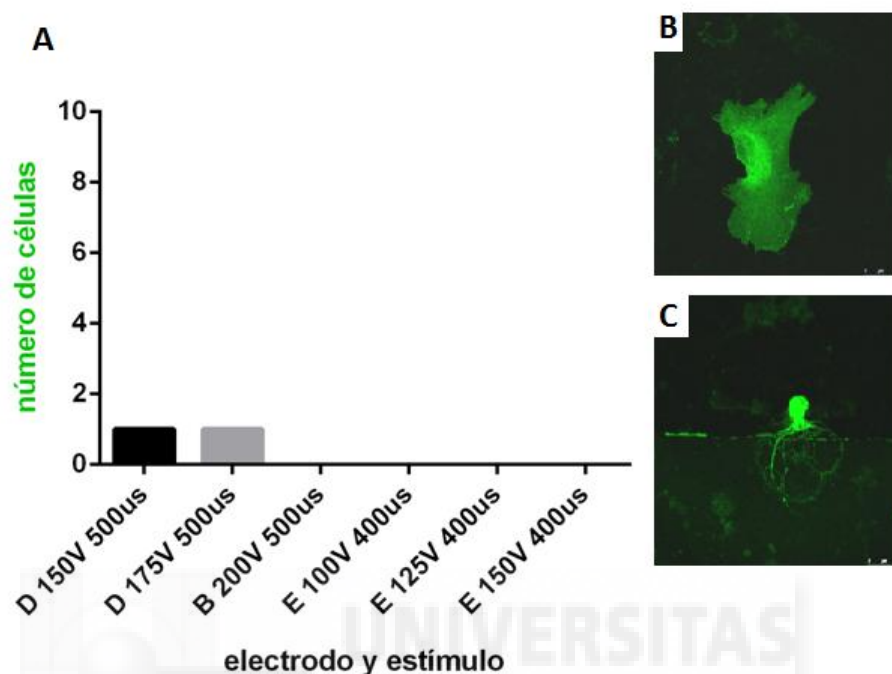


Figura 6: Ensayo para la determinación del rango eléctrico óptimo para la construcción genética con el gen CatCh en neuronas. (A) Gráfico que representa el número de células que expresan la construcción con el gen CatCh para cada estímulo. Solo se observó 1 célula con expresión en los estímulos 150 y 175V con 500μs. (B) y (C) son las células de la glía y neurona respectivamente de ambos estímulos con expresión de CatCh (YFP). Las imágenes son originales. Objetivo: 40x. Escala: 100μm.

En una primera toma de contacto en estas nuevas condiciones, los datos de expresión obtenidos tras la EP fueron mínimos, solo se consiguió visualizar una célula con el estímulo de 150V-500μs y otra con el de 175V-500μs (Figura 6.A). Este primer ensayo con el uso de la construcción portadora del gen CatCh (7kb) muestra como el tamaño del plásmido es otro factor a tener en cuenta para el éxito de la transfección, pues los valores para los que se obtenía éxito (150-200V) con la construcción genética portadora de la GFP de menor tamaño (5kb) no fueron suficientes para obtener éxito con el plásmido de 7kb. Será necesario aumentar el estímulo en posteriores ensayos con el fin de mejorar los resultados. En la Figura 6.B se observa una célula de la glía con expresión de Catch y YFP. La Figura 6.C muestra una neurona con expresión de CatCh y YFP adherida al electrodo.

Ensayos en neuroblastoma:

Se repitieron los experimentos en cultivos de neuroblastomas. Esta vez, con rangos mucho más acotados de voltajes partiendo del conocimiento de los resultados de los experimentos anteriores. Los parámetros variables se especifican en la imagen. El plásmido contenía el gen para la proteína GFP.

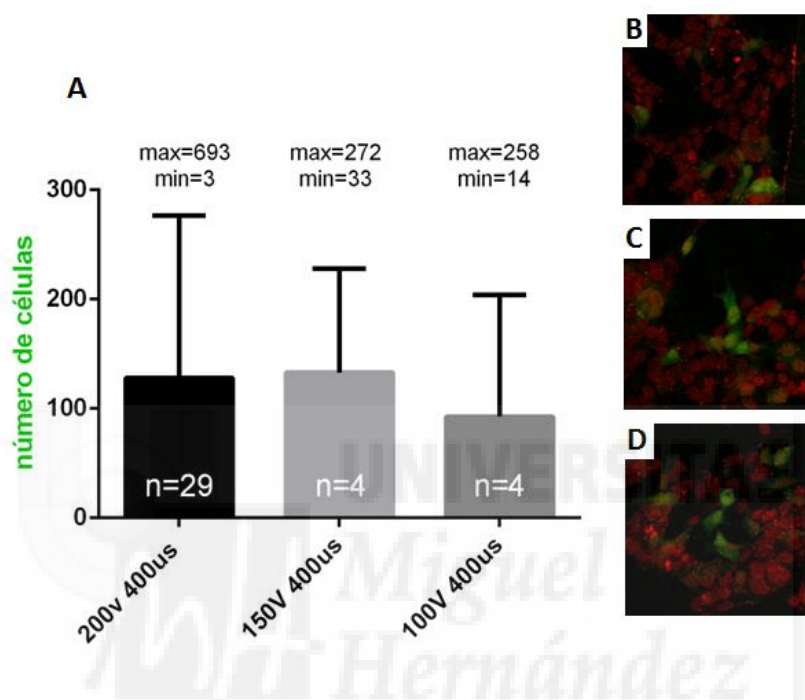


Figura 7. Ensayo de expresión en neuroblastomas. (A) Representa el valor medio para el número de células que expresan GFP en cada electrodo. Resultados: 200V-400µs (128±149 DE) con n=29, 150V-400µs (132±95 DE) con n=4, 100V-400µs (93±112 DE) con n=4. siendo $P = 0,7246$ Kruskal-Wallis. (B), (C) y (D) Ejemplos de neuroblastomas que expresaron la proteína GFP de los electrodos estimulados con 150V-400µs. Tinción de los núcleos en rojo: Hoetsch. Las imágenes son originales. Objetivo: 40x. Escala: 100µs.

La media de los resultados de expresión obtenidos para el cultivo de neuroblastomas fue de 128 ± 149 DE con $n=29$ para el estímulo de 200V y 400µs de duración del pulso, mientras que para el estímulo de 150V y 400µs se obtuvo un valor medio de expresión de 132 ± 95 DE con $n=4$, valor ligeramente superior que el estímulo anterior (Figura 7.A). El estímulo que menor valor medio de expresión obtuvo fue 100V y 400µs con 93 ± 112 DE con $n=4$. A pesar de que hubo casos en los que los datos de expresión fueron notablemente altos, llegando a alcanzar un máximo de 693 células que expresaron la proteína GFP en el primer estímulo utilizado (200V-400µs), los datos no fueron estadísticamente significativos. Sí se puede observar que en los tres estímulos hubo expresión, y como el estímulo de 100V obtuvo unos datos de expresión relativamente menores que los otros dos estímulos. En ese caso, estaríamos en el mismo rango de estímulos óptimos para la electroporación que en el caso de

las neuronas de córtex, siendo en el rango de entre 150 y 200V donde se obtuvieron los mejores datos de expresión, superando por poco el estímulo de 150V. Por lo tanto, existiría una tendencia en neuronas ligeramente mayor de expresión a voltajes más altos (200V). Esto, sin embargo, puede ser debido al bajo número de repeticiones (4) que se realizaron con el estímulo de 150V. Las Figuras 7B, C y D muestran neuroblastomas con expresión de GFP y los núcleos de las células teñidos con el reactivo Hoetsch.

A continuación se muestra un gráfico comparativo de la media de expresión de neuronas y neuroblastomas para el estímulo de 200V y 400μs, en ambos casos el estímulo con mejores datos de expresión.

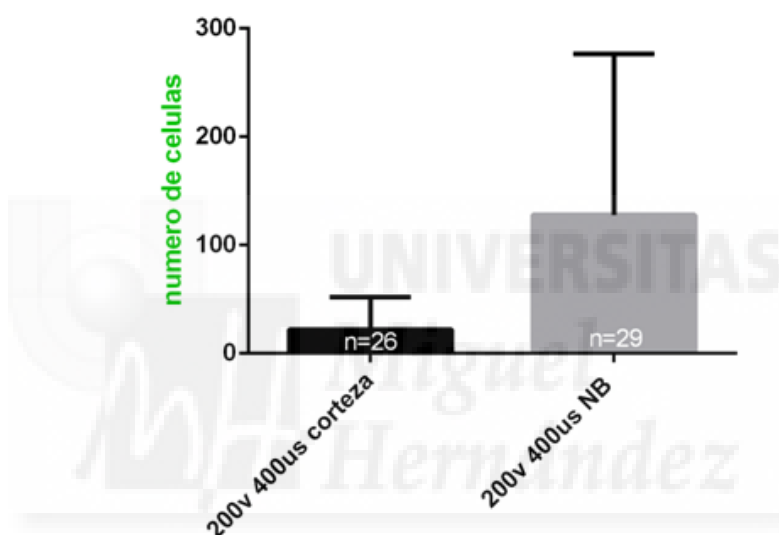


Figura 8. Gráfica comparativa de la expresión de neuronas frente a neuroblastomas. La gráfica muestra la comparación entre el valor medio de número de células expresadas para un mismo estímulo (200V-400μs) en neuronas (21 ± 30 DE) y en neuroblastomas (128 ± 149 DE), siendo $n=26$ en neuronas y $n=29$ en neuroblastomas y $P = 0,0008$ Kruskal-Wallis.

Finalmente se recoge en una gráfica comparativa el valor medio de expresión de neuronas y neuroblastomas para el estímulo de 200V y 400μs de duración del pulso y para $n=26$ en neuronas y $n=29$ en neuroblastomas. Se observó expresión en ambos tipos celulares. Sin embargo se produjo una mayor cantidad de expresión en neuroblastomas, alcanzando un valor medio de 128 ± 149 DE, mientras que las neuronas consiguen una media de 21 ± 30 células que expresan la proteína GFP, a pesar de que los datos no fueron estadísticamente significativos. Sí se pudo comprobar como la transfección de neuronas es mucho más compleja, puesto que son células mucho más complicadas de adaptar a las condiciones *in-vitro* que las neuronas, además de soportar peor la estimulación eléctrica. Por lo tanto, la transfección es mucho más costosa y como resultado se obtienen menores valores de expresión.

Ensayos para la determinación del voltaje en función del tamaño del plásmido

En estos ensayos se comparó la expresión en neuroblastomas de los cultivos que fueron electroporados con plásmidos que contenían solo el gen para la GFP (5kb) y con plásmidos que contenían el gen de la YFP y el gen CatCh (7kb). Para ambos casos se utilizó un cultivo de neuroblastoma. Los parámetros escogidos para la electroporación fueron los mismos para ambos casos: 200 voltios, 400 μ s de duración de cada pulso, 2 pulsos con 2 segundos de espacio entre cada uno. El plásmido utilizado fue la variante a estudiar en este ensayo y se especifica en la imagen.

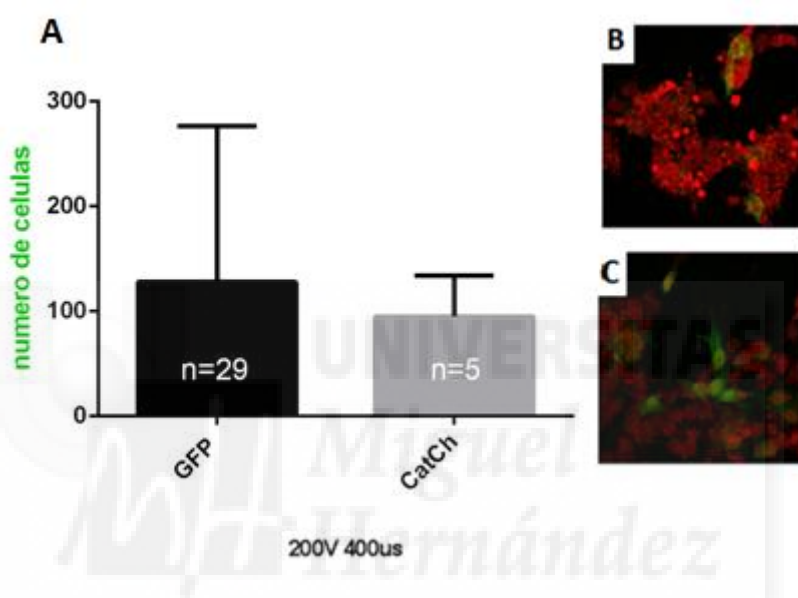


Figura 9: Ensayo comparativos con el mismo voltaje y distinto tamaño de plásmido. (A) La gráfica muestra una media del número de neuroblastomas que expresaron el gen CatCh, y por la tanto la YFP (109±39 DE) con n=5 y la expresión de la proteína GFP (132±149 DE) siendo n= 29 realizadas con el estímulo de 200V y 400 μ s de tiempo de pulso en ambos casos, siendo $P = 0,1854$ Mann-Whitney. (B) Muestra una imagen de neuroblastomas con expresión de YFP, y por tanto de CatCh. (C) Muestra neuroblastomas con expresión de GFP. En ambos casos (C y D) los núcleos de todos los neuroblastomas se observaron en rojo debido a la tinción con Hoetsch. Las imágenes son originales. El objetivo utilizado fue de 40x y la escala es de 100 μ s.

Se observó menor expresión en el caso de la construcción portadora del gen CatCh, donde el valor promedio fue de 109±39 DE siendo n=5, mientras que los neuroblastomas que solo expresaron la proteína GFP la media alcanzó un valor de 132±149 DE siendo n=29. A pesar de que los datos no fueron estadísticamente significativos y del bajo número de repeticiones en el estímulo con la construcción portadora del gen CatCh, si se observa como los parámetros óptimos (200V y 400 μ s) para la transfección de neuroblastomas con la construcción de menor tamaño (5kb) no obtuvo el mismo éxito en la transfección con la construcción portadora del gen CatCh (7kb), evidenciando así la importancia del tamaño del plásmido en el éxito de la técnica.

La *Figura 10* muestra una comparación de ejemplos de neuroblastomas con la expresión de CatCh y YFP (izquierda) y con solo GFP (derecha) con los estímulos indicados anteriormente sin la tinción de Hoechst de tal forma que se pueden observar mejor. Se puede corroborar la expresión no solo de YFP sino también de CatCh gracias a la formación del halo de expresión notable en los neuroblastomas de la imagen de la izquierda. Es sabido que el CatCh es una canal rodopsina, y por tanto se expresa en la membrana plasmática. Este aumento de expresión en los bordes, al ser las células estructuras en 3D, provocan que al ser vistas desde este ángulo se formen estos halos verdes más intensos que corroboran la expresión de CatCh. Sin embargo, en el caso de la proteína GFP su expresión es en el citoplasma, por lo que se observa un color mucho más uniforme.

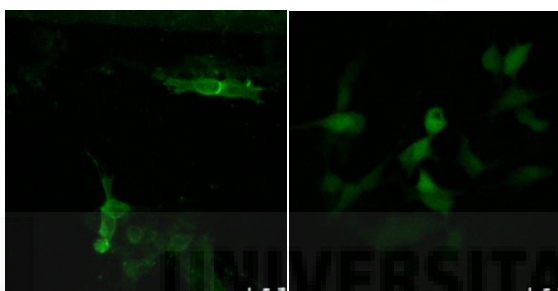


Figura 10. Formación del halo de expresión de CatCh en las membranas de neuroblastomas en comparación con la expresión de únicamente GFP. La imagen de la izquierda muestra neuroblastomas con expresión de CatCh y YFP y la imagen de la derecha muestra expresión de GFP. Imágenes originales obtenidas con el objetivo de 40x a una escala de 100µm en el microscopio confocal.

2. Ensayos para la determinación de la supervivencia celular.

Con el fin de determinar el porcentaje de células que sobrevive a la electroporación, independientemente de si expresan el plásmido o no, se llevaron a cabo una serie de experimentos tanto en neuronas fetales como en neuroblastomas. Para poder realizar estos estudios, se tomaron fotografías del cultivo con el microscopio justo antes y después de la electroporación, permitiendo así realizar un recuento de las células que sobreviven a la estimulación eléctrica.

Ensayos en neuroblastomas:

En primer lugar se ensayó la viabilidad celular en cultivos de neuroblastomas. Concretamente, los parámetros escogidos para la electroporación fueron aquellos donde se obtuvieron mejores resultados en los ensayos de expresión. Los parámetros escogidos fueron: 200V, 400µs de duración de pulso, 2 pulsos con dos segundos de tiempo entre cada uno. El plásmido contenía el gen para la GFP y para CatCh. Seguidamente se realizó el mismo

experimento pero esta vez para un voltaje de 150V, manteniendo el resto de parámetros idénticos y por último con 100V.

200V, 400 μ s, 2 pulsos con 2 seg de espacio.						
	1 zona A	1 zona B	2 zonaA	2 zona B	3 zona A	3 zona B
PreEP.	417	540	882	608	447	501
PostEP.	254	196	401	0	142	205
150V, 400 μ s, 2 pulsos con 2 seg de espacio.						
	1 zona A	1 zona B	2 zonaA	2 zona B	3 zona A	3 zona B
PreEP.	609	560	741	670	743	741
PostEP.	377	313	387	421	426	402
100V, 400 μ s, 2 pulsos con 2 seg de espacio.						
	1 zona A	1 zona B	2 zonaA	2 zona B	3 zona A	3 zona B
PreEP.	448	675	785	622	597	631
PostEP.	279	487	432	404	0	0

Figura 11. Recuento de células antes (pre) y después (post) de la electroporación (EP) en cada una de las esquinas (zona) de los electrodos.

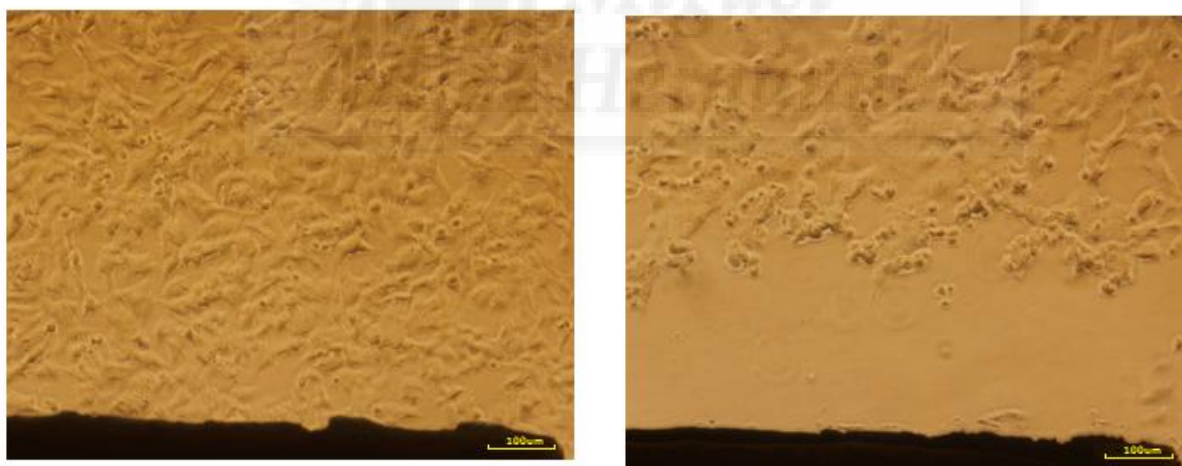


Figura 12. Electrodo antes y después de la electroporación. Imágenes originales tomadas con el microscopio antes (izquierda) y después (derecha) de realizar la electroporación. Concretamente, corresponden al primer electrodo zona A del estímulo de 200V. Con un objetivo de 10x.

Se puede observar como tras la electroporación la mayor parte de las células que mueren desaparecen de la imagen en la zona más próxima al electrodo, quedando esta parte desprovista completamente de células. Este hecho es muy frecuente en la gran mayoría de las electroporaciones. Por este motivo, es probable que los valores de supervivencia sean

superiores a los calculados, y estos queden restringidos a las zonas más próximas a los electrodos.

Cálculo de la supervivencia celular:

Para calcular el número de células que sobreviven por electrodo se han llevado a cabo las siguientes operaciones: Puesto que el método que se ha empleado ha sido el de obtener imágenes justo del mismo lugar antes y después de la electroporación con un tamaño que permita realizar el conteo, solo ha sido posible capturar en cada caso una pequeña porción del espacio entre electrodos completos tal y como muestra la imagen, capturando parte del electrodo para utilizarla como referencia y que ambas imágenes sean lo más exactas posible: De este modo, se han extrapolado los datos de la imagen tras el conteo con la escala a la cual se realiza la imagen, y sabiendo que el área que existe en cada electrodo es de $5 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$: **En el caso de los neuroblastomas electroporados con el voltaje a 200V:**

La media de células tras el recuento antes de la electroporación por imagen capturada es de **499 células/imagen**, manteniendo las células en el cultivo in-vitro. Esta imagen ha sido capturada con un objetivo de 10X, por lo que la escala nos muestra que el área de la imagen es de $876 \times 660 \mu\text{m} = 5,78 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$. A este cálculo se le resta la porción que ocuparía el electrodo en la imagen, de forma que:

$$5,76 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2 - (60 \times 660 \mu\text{m}) = 5,39 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$$

De este modo, tendríamos que hay un promedio de 499 neuroblastomas por cada $5,39 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ crecidos in-vitro.

Si dividimos el espacio total entre cada pareja de electrodos ($5 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$) entre la superficie de una imagen $5,39 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2 = 9,28$ veces se repetiría la imagen que tomamos por electrodo, que multiplicado por el número de neuroblastoma por imagen: $9,28 \times 499 =$ **4631 neuroblastomas de media crecerían en el espacio entre cada electrodo en los cultivos previos a la electroporación.**

Del mismo modo calculamos el número de células que habrían sobrevivido a la electroporación con el voltaje de 200V tras el recuento de las imágenes posteriores a la misma. La media obtenida tras el recuento es de **216 células/por imagen** (obviando el dato obtenido en el 2 cornerB donde no se observó supervivencia de ninguna célula). Puesto que las imágenes fueron tomadas de forma idéntica en ambos casos: $9,28 \cdot 216 =$ **2004 células sobrevivieron a la electroporación de 200V.**

Podemos concluir, por tanto, con que la supervivencia de las células en este experimento fue de un 43,3%.

Exactamente del mismo modo se realizaron los cálculos para todos los experimentos realizados con los distintos parámetros eléctricos, de forma que se obtuvieron los siguientes resultados de supervivencia celular:

200V	150V	100V
44%	57,2%	63%

Figura 13: Porcentaje de expresión según el estímulo usado en neuroblastomas.

Ensayos en neuronas:

En las mismas condiciones que con los neuroblastomas de córtex se contabilizaron el número de células que sobrevivían a los estímulos elegidos, pero esta vez con las neuronas de córtex.

200V, 400 μ s, 2 pulsos con 2 seg de espacio.						
	1 zona A	1 zona B	2 zonaA	2 zona B	3 zona A	3 zona B
PreEP.	321	278	309	374	241	311
PostEP.	92	60	104	117	68	83
150V, 400 μ s, 2 pulsos con 2 seg de espacio.						
	1 zona A	1 zona B	2 zonaA	2 zona B	3 zona A	3 zona B
PreEP.	328	389	431	459	355	314
PostEP.	132	162	199	232	149	111
100V, 400 μ s, 2 pulsos con 2 seg de espacio.						
	1 zona A	1 zona B	2 zonaA	2 zona B	3 zona A	3 zona B
PreEP.	286	302	345	401	374	342
PostEP.	104	113	221	329	175	130

Figura 14. Recuento de células antes (pre) y después (post) de la electroporación (EP) en cada una de las esquinas (zona) de los electrodos.

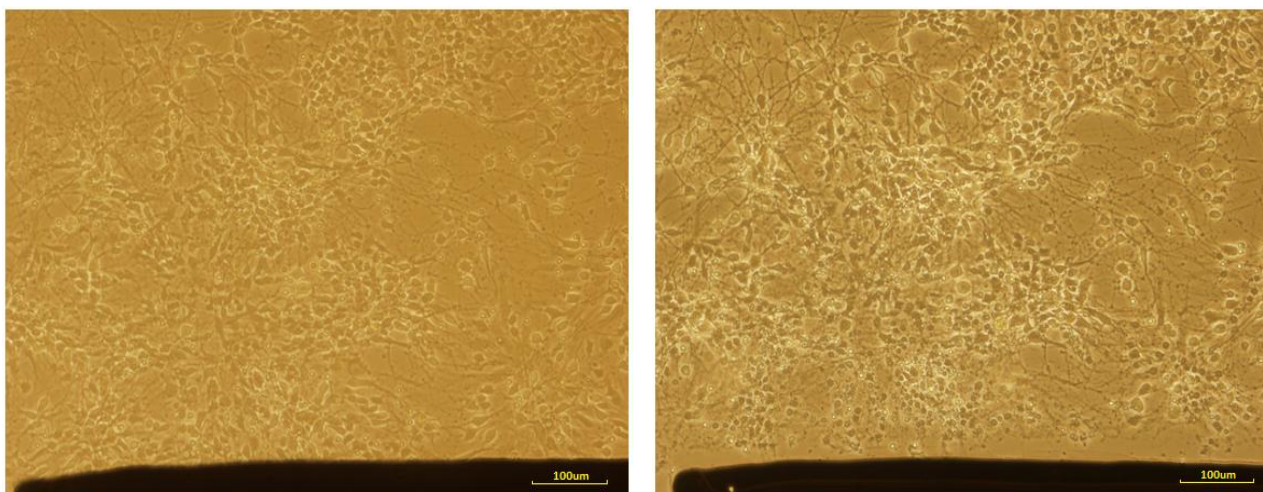


Figura 15. Electrodo antes y después de la electroporación. Imágenes originales tomadas con el microscopio antes (izquierda) y después (derecha) de realizar la electroporación. Concretamente, corresponden al segundo electrodo zona B del estímulo de 100V. Con un objetivo de 10x.

Los cálculos se realizaron del mismo modo que en el caso de los neuroblastomas, obteniéndose los siguientes resultados de expresión en neuronas de córtex:

200V	150V	100V
28,5%	43,2%	52%

Figura 16: Porcentaje de expresión según el estímulo usado en neuronas.

Se puede comprobar que tanto en neuroblastomas como en neuronas aumenta la supervivencia de las células a medida que disminuye el voltaje empleado, obteniéndose los mejores datos de supervivencia en el voltaje de 100V, siendo estos de 63% en neuroblastoma y 42% en neuronas. También se observa como en los tres casos la supervivencia de las neuronas es menor que la de los neuroblastomas, que soportarían mejor la práctica.

3. Ensayos de magnetofección.

El último ensayo se realizó añadiendo al cultivo de neuronas las magnetopartículas además del plásmido y se probaron distintos estímulos con el fin de determinar el mejor rango eléctrico para el éxito del ensayo en estas condiciones. Los parámetros eléctricos comunes fueron 2 pulsos con 2 segundos de espacio entre cada uno y los parámetros variables se

especifican en el gráfico. Se utilizaron ambas construcciones genéticas tal y como especifica. Los resultados de expresión obtenidos fueron los siguientes:

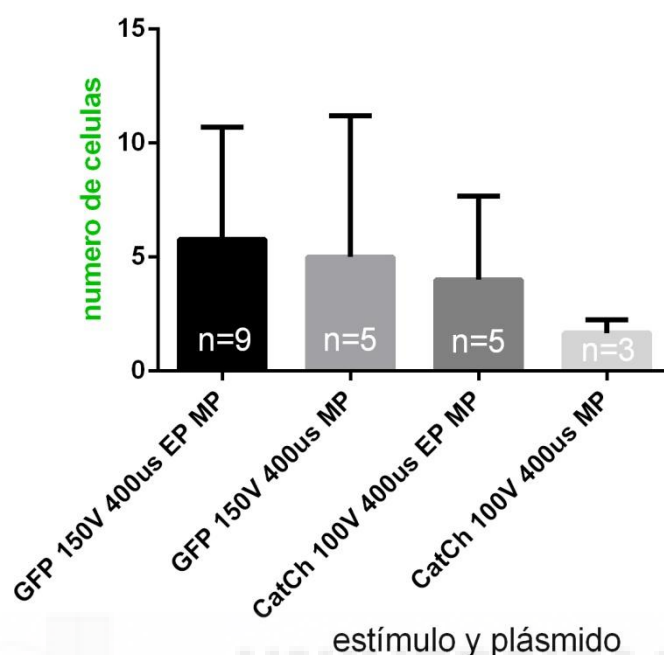


Figura 17: Ensayo de electroporación con el uso de magnetopartículas. La gráfica muestra una media del número de neuroblastomas que expresaron el gen GFP en la electroporación con 150V y 400μs con magnetopartículas (6 ± 5) con $n=9$ y el control donde solo se utilizaron magnetopartículas sin electroporación (5 ± 6) con $n=5$, y la media del valor de células con expresión para las electroporaciones con 100V y 400μs utilizando el gen CatCh y las magnetopartículas (4 ± 3) con $n=5$ y su control solo con el uso de magnetopartículas (2 ± 1) con $n=3$, siendo P de 0,53 Krustal-Wallis.

El éxito de la electroporación no fue en ningún caso superior a los experimentos realizados anteriormente, pues fueron 6 ± 5 en $n=9$ el mayor número de células con expresión en la electroporación realizada a 150V con 400μs de duración del pulso. Sin embargo, los controles obtuvieron una expresión de 5 ± 6 con $n=5$ sin realizar la electroporación, con tan solo la diferencia de una célula. En el caso del segundo estímulo, 100V con 400μs de duración del pulso, se obtuvo un resultado similar: El cultivo electroporado con magnetopartículas obtuvo una media de 4 ± 3 (con $n=5$) células con expresión, mientras que en su control se visualizó una media de 2 ± 1 con $n=3$. Por lo tanto, los datos no fueron estadísticamente significativos para determinar la electroporación con magnetopartículas mejora de la técnica que la transfección solo con el uso de magnetopartículas. Sería necesario repetir el ensayo aumentando el número de repeticiones.

Discusión:

Tras la revisión de trabajos anteriores dedicados a la electroporación y su estudio para neuronas, es notable el gran número de investigaciones que basan sus conclusiones utilizando como cultivos solamente líneas celulares. Este hecho tiene lógica si tenemos en cuenta la dificultad del mantenimiento *in-vitro* y lo delicadas que pueden llegar a ser las neuronas para este tipo de técnicas tan penetrantes. Sin embargo, y aunque son los primeros pasos hacia un nuevo sistema y técnica *in-vitro*, durante este estudio se han realizado ensayos tanto en líneas como con neuronas de córtex, probando así su funcionalidad en las células que tantas complicaciones acarrea. Pero además de esto, también incorpora a la mayoría de estudios antecedentes la inserción del gen CatCh en el plásmido, aumentando este de tamaño con respecto a los plásmidos utilizados convencionalmente, que suelen ser portadores únicamente de la proteína GFP. De este modo, y asumiendo todos los riesgos que conllevan estas prácticas, se intentará obtener algunas ideas básicas sobre estos aspectos necesarios en la ciencia a día de hoy.

Durante el primer ensayo se intentó establecer el rango óptimo de parámetros eléctricos en los cuales se obtenían mejores resultados de expresión para la construcción genética de 5kb sólo portadora del gen GFP. Para ello se establecieron primero unos parámetros fijos a todos los experimentos: 2 pulsos con dos segundos de espacio entre cada uno de ellos. Estos parámetros fueron los recomendados por el comercial de los electrodos por el éxito que provoca en la práctica convencional o en la electroporación con cubeta.

Una vez fijados estos parámetros, se probaron diferentes voltajes a diferentes tiempos de duración, obteniéndose los mejores resultados de expresión entre 150 y 200 voltios y con una duración de pulso de 400 μ s tanto en neuronas como neuroblastomas con el plásmido que sólo contenía la GFP de 5kb de tamaño (*Figuras 3, 4 y 7*). En los electrodos donde se establecieron estos parámetros fue donde se observó un mayor número de células que expresaban la proteína GFP, mientras que en rangos superiores e inferiores la expresión disminuía. A pesar de que los datos no fueron estadísticamente significativos y no se pudo esclarecer qué parámetro era el óptimo, si se pudo comprobar como la expresión en neuroblastomas, y lo que es más complicado, en neuronas, se producía con éxito utilizando rangos aproximados a 150 y 200V. Estos hechos fueron corroborados en un experimento posterior (*Figura 5*), donde se observó expresión en neuronas en todos los electrodos estimulados con estos parámetros. En voltajes o tiempos superiores al rango óptimo el número de células que expresaban la GFP disminuía considerablemente (*Figuras 3 y 4*). Esto es

debido a que voltajes o tiempos tan altos provocaban que las células se quemasen y se desprendiesen de la superficie. Sin embargo, voltajes menores o tiempos de duración del pulso más cortos no fueron suficientes para provocar la aparición de poros en las membranas y permitir así la entrada del plásmido en las células, por lo que los datos de expresión también fueron menores o nulos. Por lo tanto, los mejores datos de expresión con el uso del plásmido que sólo contenía el GFP coincidieron tanto en neuronas como neuroblastomas en un rango de 150-200V (*Figuras 3, 4 y 7*), aunque se observó una pequeña tendencia a conseguir mejor expresión en neuronas a estímulos algo mayores (200V). Para poder establecer con mayor precisión los parámetros óptimos sería necesario repetir los experimentos restringiendo aún más los parámetros eléctricos, además de variar aquellos que han sido fijados por defecto. Sin embargo, esto no ha sido posible debido a la limitación de materiales y de tiempo, por lo que la investigación puede continuar en el futuro.

Otro aspecto que merece la atención es la diferencia de expresión que existe en neuronas y neuroblastomas, consiguiéndose en este último tipo celular mayor expresión como demuestra el gráfico de la *Figura 8*. Esto puede ser debido a que las neuronas son células mucho más sensibles y complicadas de mantener *in-vitro* que los neuroblastomas, que por las características intrínsecas de las células cancerígenas, son células mucho más resistentes a cualquier factor externo. Por este motivo, las neuronas soportarían peor la estimulación eléctrica que los neuroblastomas y por tanto los datos de expresión resultarán ser menores en neuronas que en neuroblastomas. Este hecho lo corroboran los datos de supervivencia celular, donde se puede observar como los cultivos de neuroblastomas, independientemente de cuál sea el estímulo escogido soportan mejor los pulsos eléctricos que los cultivos de neuronas, los cuales tienen un rendimiento de supervivencia normalmente menor (*Figuras 12 y 15*).

En cuanto a los resultados de supervivencia se puede destacar que existe una tendencia tanto en neuronas como neuroblastomas a disminuir la supervivencia de las células a medida que aumenta el voltaje o la duración de los pulsos. Encontramos que los mejores datos de supervivencia son aquellos donde los voltajes han sido los más bajos (100V) (*Figura 12y 15*). Esto tiene una explicación sencilla, y es que si el voltaje supera la capacidad dieléctrica de la membrana esta no es capaz de soportarlo y revienta, de tal forma que conforme aumentamos el voltaje se hace más probable que suceda este hecho y mueran mayor cantidad de células reventadas o quemadas. Por lo tanto, y aunque los mejores datos de supervivencia los encontramos a voltajes de 100V, es necesario encontrar un equilibrio entre la supervivencia y el éxito de la expresión, por lo que el voltaje de 150V con 400µs es donde existen mejores datos de expresión, y la supervivencia de células sigue siendo razonable.

Otro de los factores que hay que destacar en los experimentos de supervivencia celular es la distribución que siguen las células en el electrodo una vez realizada la electroporación. Como se puede observar en los datos de supervivencia, después de electroporar mueren cierta cantidad de células quemadas por la corriente. Dependiendo del voltaje utilizado, morirán más o menos. Sin embargo, es en la zona más próxima al electrodo donde desaparecen la mayor cantidad de células (*Figura 11 y 14*). Por limitaciones técnicas, la única forma que se ha podido llevar a cabo para realizar el recuento de células ha sido la de tomar fotografías utilizando el electrodo como referencia y así fotografiar justo la misma zona antes y después de la electroporación. Sin embargo, se observa como justo en esta zona es donde mayor número de células desaparecen (*Figura 11*) o se levantan de la superficie (*Figura 14*). Por lo tanto, los resultados de supervivencia celular serían relativos a los alrededores de los electrodos. Probablemente, si este estudio se hubiese realizado tomando fotografías del centro del electrodo, los resultados de supervivencia hubiesen sido mucho mayores, ya que se observa en las *Figuras 11 y 14* como en las partes más alejadas del electrodo la supervivencia de las células es mucho mayor. Este hecho podría ser solucionado tomando fotografías con un microscopio que consiga una imagen continua del electrodo completo.

Podemos concluir la parte de supervivencia diciendo que a medida que aumentamos el voltaje o la duración de los pulsos disminuye la supervivencia de las células debido a que sus membranas no son capaces de soportar tal descarga eléctrica. Pero la supervivencia no ocurre de forma igualitaria en toda el área del cultivo del electrodo, sino que es en la parte más cercana al electrodo donde desaparecen la mayor parte de las células. Por lo tanto, será en esta zona donde la supervivencia sea menor en relación a la superficie del electrodo completo, donde probablemente también se observe una tendencia a disminuir la supervivencia con forme aumente el estímulo eléctrico pero no tan pronunciada como ocurre en los alrededores de los electrodos. De este modo encontraríamos un equilibrio entre supervivencia y expresión tomando como parámetros óptimos la estimulación tanto en neuronas como en neuroblastomas entre 150-200V y con 400 μ s de duración del pulso, equilibrio que puede ser mejorado con la variación y la continuación en el estudio de otros parámetros como el número de pulsos, el tiempo de espera entre ellos, o las distancias entre los electrodos, otro factor que puede afectar al éxito del proceso.

Otro de los aspectos que se ha tratado ha sido la relación entre la estimulación eléctrica y el tamaño del plásmido. En este caso, sólo se han utilizado plásmidos circulares y bicatenarios, por lo que otro objetivo de estudio para el futuro sería establecer los parámetros óptimos para plásmidos lineales o monocatenarios. En un primer intento de transfectar la construcción

genética de mayor tamaño (7kb) se comprobó como los parámetros óptimos para la expresión en neuroblastomas (200-150V) utilizando la construcción solo portadora de GFP (5kb), no fueron exitosos (*Figura 6*), por lo que sería necesario aumentar los estímulos con tal de mejorar los datos de expresión. La *Figura 9* muestra como el mismo parámetro para el mismo tipo de células, en este caso neuroblastomas no ofrece los mismos resultados de expresión, sino que el tamaño del plásmido, efectivamente es otra variable que determina el éxito de la transfección. Se puede observar como la electroporación realizada con la construcción genética de mayor tamaño portadora del gen CatCh y YFP (7kb) en comparación con la pequeña que solo es portadora de la GFP (5kb) obtiene peores resultados de expresión. Esto corrobora que el voltaje y el tamaño del plásmido están estrechamente relacionados. Para obtener un mayor éxito en la inserción del plásmido de mayor tamaño fue necesario utilizar parámetros eléctricos mayores. Para ello se realizaron electroporaciones utilizando voltajes de 250 y 300 Voltios con el objetivo de mejorar la transfección del plásmido que contenía el gen CatCh más la YFP. Sin embargo, los resultados de estas electroporaciones no fueron concluyentes, ya que voltajes tan elevados provocaban una disminución de la supervivencia celular. Por este motivo, es necesario continuar la investigación en proyectos futuros, donde se modifiquen otros parámetros como el número de pulsos o estimular con pulsos de distintas duraciones para intentar obtener los parámetros óptimos de EP con construcciones genéticas de otros tamaños. A pesar de ello, sí podemos asegurar que el tamaño del plásmido es otro de los elementos que interviene en el éxito de la transfección, y que por tanto requiere de su estudio para continuar estableciendo un protocolo de estimulación correcto en este nuevo sistema. Pero no solo bastaría con estudiar la transfección con plásmidos de distintos tamaños. Este sistema permite la introducción, además, de proteínas, siARN, drogas, etc. Todas estas moléculas permiten realizar estudios sobre el comportamiento de las células y pueden ser otra fuente de investigaciones futuras, de igual modo que se establecen los parámetros para la inserción de plásmidos, sería interesante realizarlo para el resto de moléculas que intervienen en el estudio de investigaciones *in-vitro*, sacándole mucho más partido al sistema.

Finalmente, el último elemento que se estudió fue la inserción de magnetopartículas para intentar aumentar los niveles de expresión. Estas partículas capturan los plásmidos, y mediante el uso de un imán, somos capaces de atraerlas hasta el fondo del cultivo y aumentar así el grado de contacto entre el material genético y la superficie de las células. Esto nos lleva a pensar que los resultados de expresión deberían ser mayores, puesto que existe una mayor facilidad para que el ADN entre dentro de las células una vez realicemos los poros en las membranas. Sin embargo, los resultados de expresión no superaron los resultados obtenidos

sin el uso de estas pequeñas partículas(Figura 16).Durante el transcurso de esta práctica ocurrió un fenómeno interesante que cabe comentar; en aquellos cultivos donde se utilizaron las magnetopartículas, se pudo observar como estas se dirigían y se depositaban en mayor cantidad encima de los electrodos, posiblemente por algún efecto electroatrayente, quedando mucha menor concentración de magnetopartículas disponibles para la zona entre electrodos donde se encuentra fijado el cultivo de células. Este hecho no pudo ser captado por el microscopio, ya que la zona del electrodo no permite pasar la luz y obtener una imagen. Esto podría ser una de las posibles razones por la que la práctica con magnetopartículas no interfiere en el éxito de la prueba, ya que verdaderamente no mejoraría la interacción entre plásmido y la célula, acumulando el material genético donde no hay cultivo, encima de los electrodos de oro. A pesar de ello, los datos no fueron estadísticamente significativos, por lo que sería necesario repetir el ensayo en mayor número de electroporaciones y así poder obtener conclusiones más claras acerca de la acción de estas pequeñas partículas metálicas sobre la técnica de EP.

Por lo tanto, todos estos estudios han servido para empezar a allanar un camino hacia conseguir optimizar la técnica, pero todavía quedan muchos estudios que realizar y que seguir probando. Para ello, posibles investigaciones futuras tienen la responsabilidad de hacer mediante la variación de estímulos y parámetros que por falta de tiempo o de material no pudieron ser llevadas a cabo en este estudio. Además de aportar el conocimiento que otros autores han llevado a cabo sobre la técnica de EP en los últimos años variando la técnica mediante el uso de otros factores y materiales que se ha visto como también influyen en el éxito del proceso.

Uno de estos aspectos que recientemente se ha descubierto puede influir en el proceso son los niveles de Calcio extracelulares^{xliii}, y más concretamente en la EP de neuronas. El calcio puede jugar un papel importante en la regeneración de las membranas de neuronas después de ser electroporadas. Al llegar el impulso nervioso al terminal presináptico se induce la apertura de los canales para calcio dependientes del voltaje. Como consecuencia el incremento de calcio intracelular activa la exocitosis de las vesículas sinápticas que liberan el neurotransmisor en el espacio intersináptico, interacciona con el receptor de la neurona postsináptica y continúa el impulso nervioso al resto de neuronas^{xliv} Por lo tanto, una elevada concentración de calcio extracelular puede ayudar a que el número de vesículas sinápticas que liberen neurotransmisores sea mayor, lo cual conduce a que un mayor número de vesículas se fusionen con la membrana citoplasmática y por tanto aumente la probabilidad de reparar los

poros ocasionados tras la EP de neuronas, aumentando así la supervivencia de las mismas y por tanto, su transfección. El estudio de este nuevo concepto y su relación con la optimización del proceso es una perspectiva de futuro interesante en la que trabajar.

Otro trabajo interesante es el realizado por *Tomás García Sánchez* en 2012. En este estudio se describe un sistema donde las células crecen adheridas a una superficie de crecimiento convencional, como pueda ser una placa Petri. Los electrodos se encuentran situados arriba del cultivo, de forma que cuando se quiere producir la electroporación estos se acercan hacia el fondo donde crecen las células y dejan una pequeña distancia de separación de 10µm, gracias a unos microseparadores hechos a base de epoxi, impidiendo así el contacto directo con las células de forma que se forman campos eléctricos más uniformes. Este aspecto tiene dos ventajas: por una parte, se evita el crecimiento de células en los electrodos, por lo que su crecimiento es mucho más eficiente, y por otra parte se minimiza la invasividad de la operación, debido a la separación entre las células y los electrodos, aplicando un campo más uniforme y evitando los problemas que se generan en los márgenes de los electrodos debidos a la corriente eléctrica^{xlv}. Sin embargo, mediante este sistema la electroporación es la misma para todo el cultivo. Con nuestro sistema es posible electroporar el cultivo con 3 estímulos distintos (uno por cada electrodo), y además sería posible utilizar distintos plásmidos para cada electroporación cambiando el medio con el plásmido adecuado antes de realizar cada una de ellas. Por lo tanto, una opción sería la combinación de ambos métodos utilizando las ventajas de cada uno.

El uso de la fuerza electroestática es otro de los elementos que se puede combinar con la práctica para intentar mejorar los resultados, como cuenta *Keng-ShiangHuang* en su estudio.^{xlvi} Como ocurre durante la práctica de electroforesis, la separación de dos electrodos provoca que las partículas cargadas negativamente como el ADN se dirijan hacia el polo positivo. Este fenómeno puede ser útil para concentrar el ADN en la superficie celular, de forma que se genere un electrodo de carga positiva en el centro, donde se haga crecer el cultivo, y el electrodo negativo se sitúe a los extremos, de tal modo que se forme una corriente del electrodo negativo al positivo, tal y como ocurre durante la electroforesis, y ésta arrastre consigo las partículas de ADN hacia el cátodo, zona donde habrá crecido el cultivo y por tanto entrarán en contacto de forma mucho más eficiente gracias a esta fuerza electroestática. Esto podría ser una alternativa al uso de las magnetopartículas en la mejora del contacto ADN-célula.

Conclusiones y perspectivas futuras.

Durante este estudio se han realizado distintos ensayos de transfección con éxito utilizando el nuevo sistema para diferentes tipos de células fijadas en superficie. Hemos comprobado el rango de voltaje y duración de pulso que ofrece el mejor equilibrio entre expresión y supervivencia de las células, además de la relación que existe entre el tamaño del plásmido y la eficacia de transfección. La optimización del proceso puede continuar en investigaciones futuras variando parámetros como el voltaje, tiempo de duración, número de pulsos, distancia entre los electrodos, la concentración del plásmido, las magnetopartículas o el empleo de la fuerza electrostática para la posible optimización del proceso mediante el aumento del contacto ADN-célula. Por otra parte el estudio de los niveles de calcio extracelular como posible sellante después de la formación de los poros durante la técnica, o la separación de los electrodos del cultivo para disminuir los daños en las células. Todos ellos son posibles estudios futuros que podrán mejorar la técnica y obtener mejores resultados con este nuevo sistema de electroporar, acabando por protocolizarlo de forma que se puedan realizar cualquier tipo de transfección en células, suministrar proteínas, siARN, o cualquier molécula que permita avanzar en investigación, haciendo de esta técnica una herramienta útil, sencilla, económica y necesaria para el desarrollo de la ciencia.

Bibliografía

ⁱ **Mammalian cell transfection: the present and the future.** Tae Kyung Kim and James H. Eberwine. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Aug; 397(8): 3173–3178.

ⁱⁱ **Targeting gene therapy to cancer: a review.** Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, Chaplin DJ. 1997, 9(6-7):313-325

ⁱⁱⁱ **Barriers to nonviral gene delivery.** Christopher M. Wiethoff, C. Russel Middaugh. *Journal of pharmaceutical Sciences* 2002.

^{iv} **Mammalian cell transfection: the present and the future.** Tae Kyung Kim and James H. Eberwine. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Aug; 397(8): 3173–3178.

^v **Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector.** U Blömer, L Naldini, T Kafri, D Trono, I M Verma and F H Gage. *J. Virol.* September 1997 vol. 71 no. 9 6641-6649

^{vi} **Gene therapy: Promises and Problems.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics* Vol. 2: 177-211. September 2001.

^{vii} **An improved approach for transformation of plant cells by microinjection: molecular and genetic analysis.** Martin Schnorf, Gabriele Neuhaus-Url, Alessandro Galli, Shigeru Iida, Ingo Potrykus, Gunther Neuhaus. *Transgenic Research* December 1991, Volume 1, Issue 1, pp 23-30

^{viii} **Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection.** ROBERT E. HAMMER*, VERNON G. PURSEL*, CAIRD E. REXROAD JR*, ROBERT J. WALL*, DOUGLAS J. BOLT*, KARL M. EBERT*, RICHARD D. PALMITER* & RALPH L. BRINSTER*. *Nature* 315, 680 - 683 (20 June 1985)

- ^{ix} **High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.** Mario R. Capecchi
Cell press Volume 22, Issue 2, Part 2, November 1980, Pages 479–488
- ^x **Vivo and in-vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.** Yang N-S, Burkhelberg J, Roberts B, Martinell B, McCahe D. In *ProcNatlAcadSci USA* 1990;87:9568-9572.
- ^{xi} **High velocity mechanical injection for foreign DNA into fish eggs.** Kolesnikov VA, Alimov AA, Barmintsev VA, Benyumov AO, Zelenina IA, Kraasnov AM, Dzhabur R, Zelenin AV. *Genetika (Moskva)* 1990;26:2122-2126.
- ^{xii} **In vivo and in-vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.** Yang N-S, Burkhelberg J, Roberts B, Martinell JB, McCahe D. *ProcNatlAcadSci USA* 1990;87:9568-9572.
- ^{xiii} **Heterologous and Homologous Protection Against Influenza A by DNA Vaccination: Optimization of DNA Vectors** Donna L. Montgomery, jonh W.Shiver , 1993, 12(9): 777-783. doi:10.1089/dna.1993.12.777.
- ^{xiv} **Mammalian cell transfection: the present and the future.** Tae Kyung Kim and James H. Eberwine. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Aug; 397(8): 3173–3178.
- ^{xv} **Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA.** Chen C, Okayama H. *BioTechniques* 1988;6:632.
- ^{xvi} **DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells.** Schenborn ET, Goiffon V (2000) *Meth MolBiol* 130:147–153
- ^{xvii} **Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenzel M et al. *ProcNatlAcadSci USA* 1987;84:7413-7417.
- ^{xviii} **Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA.** Chen C, Okayama H. *BioTechniques* 1988;6:632.
- ^{xix} **Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay.** Vaheri A, Pagano JS. *Virology* 1965;27:434.
- ^{xx} **Infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in presence of diethylaminoethyl-dextran.** Warden D, and Thorne HV. *J Gen Virol* 1968;3:371-375.
- ^{xxi} **DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells.** Schenborn ET, Goiffon V (2000) *Meth MolBiol* 130:147–153
- ^{xxii} **Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenzel M et al. *ProcNatlAcadSci USA* 1987;84:7413-7417.
- ^{xxiii} **Liposomes from Physical Structure to Therapeutic Application.** Bangham AD. Introduction. In: Knight G, New York: Elsevier, 1981
- ^{xxiv} **Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenzel M et al. *ProcNatlAcadSci USA* 1987;84:7413-7417.
- ^{xxv} **The Magnetofection Method: Using Magnetic Force to Enhance Gene Delivery.** Plank C., Schillinger U., Scherer F., Bergemann C., Remy J.-S., Krötz F., Anton M., Lausier J. and Rosenecker J. *Biol. Chem.* May 2003; 384: 737-747.
- ^{xxvi} **Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.** E Neumann, M Schaefer-Ridder, Y Wang, and P H Hofschneider
- ^{xxvii} **Relaxation studies on cell Membranes and lipid bilayers in the high electric field range,** R. Benz, and U. Zimmermann, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7 (1980) 723-739.
- ^{xxviii} **Transfer of monoclonal antibodies into mammalian cells by electroporation,** H. Lambert, R. Pankov, J. Gauthier, R. Chakrabarti, D.E. Wylie and SM. Schuster, *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 15494-15500.
- ^{xxix} **Electroporation-mediated uptake of proteins into mammalian cells,** H. Lambert, R. Pankov, J. Gauthier and R. Hancock D.C. Bartoletti, G.I. Harrison *Biochem. Cell Biol.*, 68 (1990) 729-734.
- ^{xxx} **Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.** H Potter, L Weir, and P Leder. *Current Issue* vol. 81 no. 22> H Potter, 7161–7165
- ^{xxxi} **Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation.** M Fromm, L P Taylor, and V Walbot. *Current Issue* vol. 82 no. 17> M Fromm, 5824–5828
- ^{xxxii} **Theoretical modeling of the effects of shock duration, frequency, and strength on the degree of electroporation** Anna O. Bilska a, Katherine A. DeBruina,b, Wanda Krassowskaa,b, *Bioelectrochemistry* 51 2000. 133–143
- ^{xxxiii} **Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation.** Senda, M., J. Takeda, A. Shunnosuke, and T. Nakamura. 1979. *Plant Cell Physiol.* 20:1441-1443.
- ^{xxxiv} **Temperature effects on resealing electrically hemolysed rabbit erythrocytes,** K.P. Mishra and A.B. Singh, *Ind. J. Exp. Biol.*, 24 (1986) 737-741.
- ^{xxxv} **Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview** Masa Kanduser and Damijan Miklavcic
- ^{xxxvi} **Application of In Vivo Electroporation to Cancer Gene Therapy.** Tamura, T.; Sakata, T. *Current Gene Therapy*, Volume 3, Number 1, February 2003, pp. 59-64(6)

^{xxxviii} **"A new approach to neural cell culture for long-term studies."** J Neurosci Methods 110(1-2): 17-24. Potter, S. M. and DeMarse, T. B. (2001).

^{xxxviii} **Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture.** Biedler JL, Helson L, Spengler BA (November 1973). Cancer Res. **33** (11): 2643–52

^{xxxix} **Theory of electroporation: A review** James C. Weaver a, Yu.A. Chizmadzhev Bioelectrochemistry and Bioenergetics 41 (1996) 135-160

^{xi} **Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration** Pamela S Lagali, David Balya, Gautam B Awatramani, Thomas A Münch, Douglas S Kim, Volker Buskamp, Constance L Cepko & Botond Roska. Nature vol. 11 number 6. 667-675.

^{xli} **Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior.** Marc Zimmer *Chem. Rev., 2002, 102 (3), pp 759–782

^{xlii} **"A new approach to neural cell culture for long-term studies."** J Neurosci Methods 110(1-2): 17-24. Potter, S. M. and DeMarse, T. B. (2001).

^{xliii} **Calcium-regulated Exocytosis Is Required for Cell Membrane Resealing** Guo-Qiang Bi, Janet M. Alderton, and Richard A. Steinhardt

^{xliv} **The synaptic vesicle cycle.** Journal Article, Review, Research Support, Non-U.S. Gov't,

^{xlv} **Design and Implementation of a Microelectrode Assembly for Use on Noncontact In Situ Electroporation of Adherent Cells.** Tomás García-Sánchez, Beatriz Sánchez-Ortiz, Ingrid Vila, Maria Guitart, Javier Rosell, Anna M. Gómez-Foix, Ramón Bragó's.

^{xlvi} **Enhancement of an Electroporation System for Gene Delivery Using Electrophoresis with Planar Electrodes.** Keng-Shiang Huang, Min Li, Chi-Chang Su, Hau-Hsuan Huang, Chun-Sheng Fang, and Yu-Cheng Lin. Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference. 2005

